

Enzymhemmung durch Copolymere aus aminosäurespezifischen Monomeren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Kirstin Wenck

aus Henstedt-Ulzburg

Fakultät für Chemie der
Universität Duisburg-Essen

Essen, 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gebhard Haberhauer

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. Stefan Schulz

Tag der Disputation: 12.07.2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader in der Zeit von Oktober 2006 bis Mai 2010 an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die Überlassung dieses spannenden Themas und die zahlreichen anregenden Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Torsten Schaller und Heinz Bandmann danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und ihre Hilfe und Unterstützung bei allen spektroskopischen und computertechnischen Fragen.

Heike Wöll möchte ich für die Messung der GPC- und Massenspektren danken.

Klaus Kowski und Ingeborg Reiter danke ich recht herzlich für ihre Unterstützung bei allen technischen und bürokratischen Problemen.

Lisa Siever möchte ich für ihre Hilfe während ihrer Ausbildung danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Silvia Ernst und Dr. Torsten Schaller – danke für die hilfreichen Tipps.

Allen Mitarbeitern der 5. Etage möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Ohne Euch wäre ich so manches Mal verzweifelt.

Mein besonderer Dank gilt Caro und Marc für ihre Freundschaft und die schöne Zeit – den Mädels, die mich trotz Lustlosigkeit immer wieder zum Sport verleitet haben – Torsten und Silvia für die rätselhaften Mittagspausen – Katrin, die mir in ihrer unverwechselbaren Art immer neuen Mut gemacht hat – und allen, die die freitägliche Frühstücksrunde aufrechterhalten haben.

Christian Renner möchte ich danken, weil er mir auch nach seiner Promotion mit seinem Rat und seiner Erfahrung weitergeholfen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und bei David für ihre Unterstützung und Liebe während meiner Promotion und des gesamten Studiums.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder auf Kongressen präsentiert worden:

K. Wenck, S. Koch, C. Renner, W. Sun, T. Schrader, A Noncovalent Switch for Lysozyme, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 16015.

T. Schrader, C. Renner, S. Koch, K. Wenck, *Oligomere Bisphosphonat-Pinzetten zur molekularen Assemblierung von Proteinen*, Poster in Rahmen des Workshops „ChemBionics: Prospects of biohybrid molecules“, Rauischholzhausen, **2006**.

K. Wenck, M. Blecking, W. Sun, T. Schrader, *Designed Oligomers for Protein Assembly*, Poster im Rahmen des Workshops “NanoBionics IV: From Molecules to Applications”, **2007**.

Schalten von Lysozym durch maßgeschneiderte Copolymere, Vortrag im Rahmen des 12. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Xanten, **2006**.

Schalten von Lysozym durch maßgeschneiderte Copolymere, Neujahrskolloquiums der Universität Duisburg-Essen, **2007**.

Hemmung von Proteasen und Lipasen durch maßgeschneiderte Polymere, Vortrag im Rahmen des 15. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Xanten, **2009**.

Inhalt

1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1. Inhibierung von Enzymen durch Oberflächenerkennung	- 2 -
1.2. Molekular geprägte Polymere	- 10 -
1.3. Oberflächenerkennung mit Bisphosphonatpinzetten	- 15 -
1.4. Grundlagen und Funktionsstörungen des Verdauungssystems	- 18 -
1.4.1. Pankreas	- 18 -
1.4.2. Akute Pankreatitis	- 18 -
1.4.3. Ischämie und Reperfusionsschaden (IRS)	- 23 -
2. AUFGABENSTELLUNG	- 25 -
3. DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE.....	- 27 -
3.1. Monomere	- 27 -
3.1.1. Erkennung basischer Aminosäuren	- 30 -
3.1.2. Erkennung saurer Aminosäuren	- 32 -
3.1.3. Histidin-Erkennung.....	- 35 -
3.1.4. Erkennung aromatischer Aminosäuren.....	- 38 -
3.1.5. Substratmimetische Monomere	- 41 -
3.1.6. Diskussion	- 45 -
3.2. Polymere	- 47 -
3.2.1. Entwurf der Polymere.....	- 47 -
3.2.2. Synthese der Polymere.....	- 49 -
3.2.3. Analyse der Polymere	- 51 -
3.2.4. Diskussion	- 57 -
3.3. Enzyminhibierung	- 59 -
3.3.1. Allgemeine Vorgehensweise.....	- 60 -
3.3.2. Messmethoden.....	- 60 -
3.3.3. Chymotrypsin	- 66 -
3.3.4. Trypsin.....	- 70 -
3.3.5. Cathepsin D	- 77 -
3.3.6. Pankreaslipase.....	- 85 -
3.3.7. Thrombin	- 91 -
3.3.8. Diskussion	- 94 -

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	- 98 -
4.1. Zusammenfassung.....	- 98 -
4.2. Ausblick.....	- 101 -
5. EXPERIMENTELLER TEIL.....	- 103 -
5.1. Materialien.....	- 103 -
5.2. Synthese der Monomere.....	- 106 -
5.2.1. <i>N</i> ^F -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^F -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester.....	- 106 -
5.2.2. <i>N</i> ^F -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester.....	- 107 -
5.2.3. <i>N</i> ^F -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- <i>N</i> ^F -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester	- 108 -
5.2.4. <i>N</i> ^F -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- <i>N</i> ^F -bis(carboxymethyl)-L-lysin.....	- 109 -
5.2.5. Trichloracetylpyrrol.....	- 110 -
5.2.6. 1 <i>H</i> -Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester	- 111 -
5.2.7. Formylpyrrolcarbonsäurebenzylester.....	- 112 -
5.2.8. 1 <i>H</i> -Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester	- 113 -
5.2.9. 1 <i>H</i> -Pyrrol-5- <i>N</i> -Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester	- 114 -
5.2.10. 1 <i>H</i> -Pyrrol-5- <i>N</i> -Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure	- 115 -
5.2.11. 1 <i>H</i> -Pyrrol-5- <i>N</i> -Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)-ethyl]amid.....	- 116 -
5.2.12. 1 <i>H</i> -Pyrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid ..	- 117 -
5.2.13. <i>N</i> -Boc-Guanidin.....	- 118 -
5.2.14. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol	- 119 -
5.2.15. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin	- 120 -
5.2.16. <i>N</i> -[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid.....	- 120 -
5.2.17. Dilithium- <i>N</i> -[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid.....	- 122 -
5.2.18. <i>N</i> -Boc-Ethylendiamin	- 123 -
5.2.19. <i>N</i> -{2-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]ethyl}methacrylamid	- 123 -
5.2.20. <i>N</i> -(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid	- 124 -
5.2.21. 6 ^A - <i>o</i> -(<i>p</i> -Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin	- 125 -
5.2.22. 6 ^A -Deoxy-6 ^A - <i>N</i> -(2-aminoethylimino)- β -cyclodextrin	- 126 -
5.2.23. 6 ^A -Deoxy-6 ^A - <i>N</i> -[(2-aminoethylimino)acrylamid]- β -cyclodextrin	- 127 -
5.2.24. Stearinsäure-[2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid	- 128 -
5.2.25. 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester	- 129 -
5.2.26. 6- <i>tert</i> -Butoxycarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure-methylester	- 130 -
5.2.27. 6-Amino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure	- 131 -
5.2.28. 2-(2-Methylacryloylamino)propionsäuremethylester	- 132 -

5.3. Synthese der Polymere.....	- 134 -
5.3.1. Stammlösungen	- 134 -
5.3.2. allgemeine Arbeitsvorschrift der Polymerisation	- 135 -
5.3.3. Polymere	- 135 -
5.4. Enzyminhibierungen	- 173 -
5.4.1. Chymotrypsin	- 173 -
5.4.2. Trypsin.....	- 179 -
5.4.3. Cathepsin D	- 188 -
5.4.4. Pankreaslipase.....	- 206 -
5.4.5. Thrombin	- 211 -
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 216 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 219 -
8. SPEKTRENANHANG	- 225 -

1. Einleitung

Proteine finden in der Natur vielfältigen Einsatz. Sie treten als Strukturproteine, Enzyme, Ionenkanäle, als Transportproteine, Hormone und Antikörper auf.

Niedermolekulare Substanzen, die dem natürlichen Substrat nachempfunden sind, können im aktiven Zentrum von Enzymen durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden und so gezielt pathologische Transformationen blockieren.^[1] Derzeit sind etwa 6500 Zielproteine für die medizinische Wirkstoffentwicklung bekannt.^[2]

Wechselwirkungen zwischen Proteinen erfolgen meist über Kontaktflächen auf der Oberfläche. Werden solche Protein-Protein-Wechselwirkungen als pharmazeutisch interessant hinzugerechnet, steigt die Zahl der Zielproteine für die medizinische Chemie stark.

Diese Wechselwirkungen können selektiv und effektiv durch Antikörperbindung beeinflusst werden. Sie wird in der industriellen Proteinreinigung durch festphasengebundene Antikörper genutzt, nimmt aber auch in der klinischen Diagnose und biomedizinischen Forschung einen hohen Stellenwert ein. Limitiert ist der Einsatz von Antikörpern aufgrund ihrer Empfindlichkeit und ihrer Produktion in lebenden Zellen. Die Qualitätskontrolle sowie die gezielte Herstellung von Antikörpern gegen bestimmte Proteine erweist sich häufig als schwer.

Auf industrieller Seite besteht daher ein großes Interesse, über selektive Erkennung von Proteinoberflächen durch künstliche Rezeptoren Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu beeinflussen. So können Enzyme selektiv inhibiert und damit biologische Prozesse gezielt gesteuert werden.^[3]

Einerseits findet die Oberflächenerkennung von Proteinen Anwendung in der biomedizinischen Diagnostik^[4], andererseits können die entsprechenden Rezeptoren zur Proteinreinigung und Immobilisierung auf stationären Phasen^{[5], [6], [7]} verwendet sowie als Biosensoren eingesetzt werden^[8].

1.1. Inhibierung von Enzymen durch Oberflächenerkennung

Künstliche Rezeptoren, die Proteine auf der Oberfläche binden und erkennen, können natürlichen Bindungsmotiven wie Peptiden entsprechen, oder aber aufgrund rationalen Designs gefunden und optimiert werden.

Proteinkinasen kommen in vielfältiger Zahl in der Natur vor. Obwohl sie sich in ihrer Funktion stark unterscheiden, ähneln sich die Strukturen ihrer aktiven Zentren. Künstliche selektive Proteinkinase-Hemmer sind daher selten. Das die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) inhibierende Protein (PKI) trägt auf der Oberfläche eine PKA-bindende Domäne. *Shepartz et al.* verknüpften ein der PKA-bindenden Domäne nachempfundenen Miniatur-Protein-Konjugat (MPK) kovalent mit dem stark bindenden, unselektiven Kinase-Hemmer K252a. ^[9]

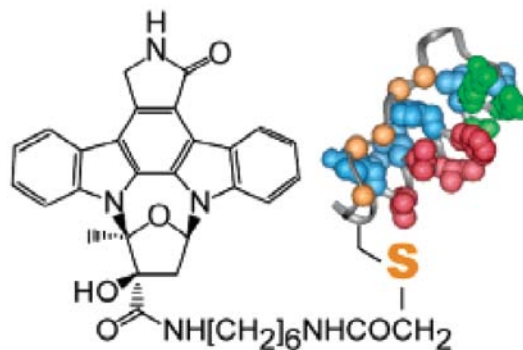
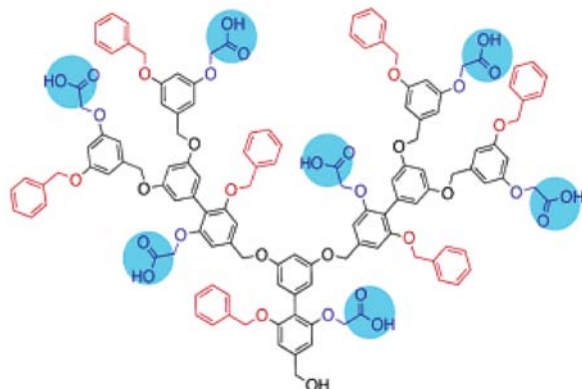


Abb. 1.1: MKA-K252a (MKA \equiv PKI₅₋₂₄: GPSQP TYPGD DAPVE DLIRF YNDLT YYLFV VSGRT GRRNA IHDO). ^[9]

Die Selektivität zu PKA wurde durch die Kupplung des Indolcarbazol-Naturstoffs, der als Inhibitor im aktiven Zentrum von Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen gebunden wird, mit dem MKA erhöht, und es wurde ein neuer, stark bindender, selektiver PKA-Inhibitor identifiziert.

Thayumanavan et al. entwickelten faziale amphiphile Biaryldendrimere zur molekularen Erkennung von Chymotrypsin.^[10]

a.



b.

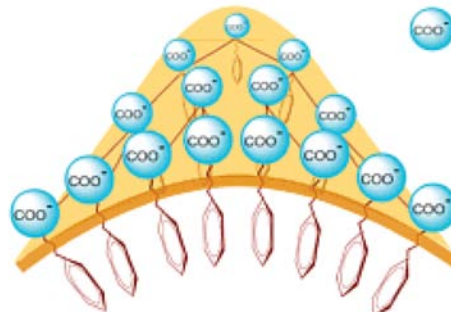


Abb. 1.2: Faziale amphiphile Biaryldendrimere:

a. Struktur des G-3 Dendrimers, **b.** schematische Darstellung der räumlichen Anordnung.^[10]

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Präorganisation der Dendrimere durch Aggregation (Abb. 1.2.b.) hohe Bindungskonstanten bereits bei kleinen Dendrimern erzielt werden können. In Abb. 1.2.a. ist die kritische Dendrimergröße des G-3 Dendrimers dargestellt, mit kleineren Dendrimern kann keine Bindungsaffinität beobachtet werden. Im Vergleich mit klassischen amphiphilen Dendrimern der gleichen Größe kann das G-3 Dendrimer die doppelte Menge an Chymotrypsin-Molekülen binden.

Anionisch und lipophil funktionalisierte Diphenylmethan-Oligomere wurden von *Regan et al.* als potente Inhibitoren der Humanen Leukozyten Elastase (HLE) identifiziert.^[11]

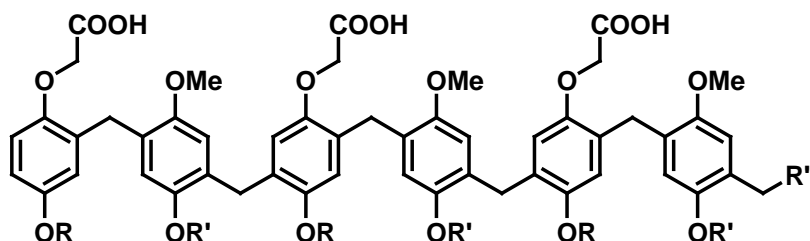


Abb. 1.3: Aufbau eines Biphenyl-Oligomers ($R = H, Me$; $R' = H, Alkyl, CH_2Ph, CH_2O(CH_2)_2OMe$; $R'' = H, OH$).^[11]

Die Inhibierung wird durch die Oligomergröße und die Anzahl an Ladungen reguliert. Die lipophilen Reste erhöhen die Bindungsaffinität sowie die Spezifität gegenüber anderen basischen Enzymen. Die stärkste inhibitorische Wirkung zeigte ein Oligomer mit drei Phenoxyacetat-Gruppen und drei Alkylether-Funktionalitäten mit $K_i = 21$ nM. Die Bindung erfolgt auf der Oberfläche der HLE in der Nähe des aktiven Zentrums, so dass der Substratzugang blockiert wird.

Kulkarni et al. stellten thermopräzipitierende Polymere zur Lysozym-Inhibierung und -Reinigung her.^[12]

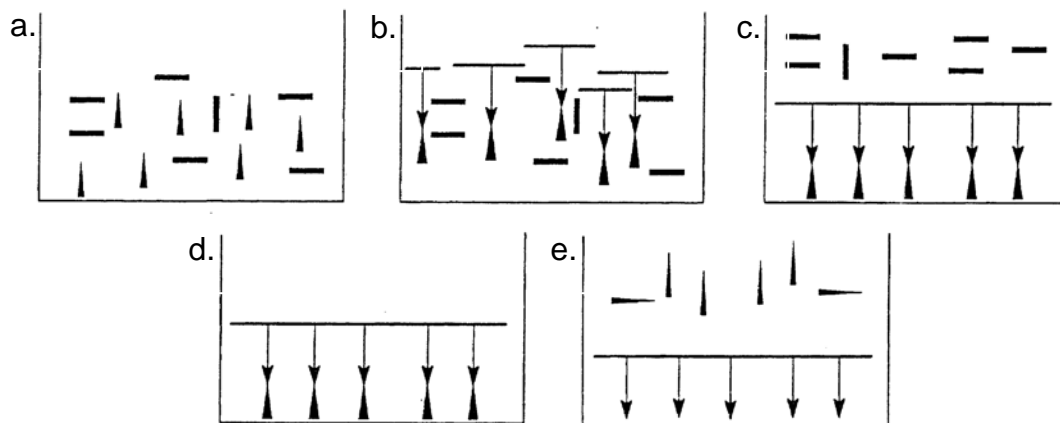


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Thermopräzipitation von Lysozym:

a. Proteingemisch; **b.** Bindung der Polymere an Lysozym; **c.** durch Temperaturänderung hervorgerufenenes Ausfallen des Polymer-Lysozym-Komplexes; **d.** Abtrennen des Komplexes von in Lösung vorliegenden Proteinen; **e.** Dissoziation durch pH-Änderung.^[12]

Durch Copolymerisation von Monomeren mit Acetamido-Liganden mit einem Spacer, Aryl-Monomeren und NIPAM wurden Lysozym-bindende Polymere synthetisiert. Wie in Abb. 1.4 dargestellt, bildet sich bei Zugabe des Polymers ein Lysozym-Polymer-Komplex aus, der durch Temperaturerhöhung ausfällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation abgetrennt. Der Komplex dissoziiert bei Verringerung des pH-Wertes. Die Affinität zu Lysozym kann durch Verlängerung der Spacer und Erhöhung der Hydrophilie verstärkt werden. Dadurch werden sowohl die inhibitorischen Eigenschaften der Polymere erhöht, als auch die Selektivität bei der Reinigung von Lysozym aus Proteingemischen verbessert.

Übergangsmetall-Komplexe sind ein weiterer Zugang zur Erkennung von Proteinen. Jedes Protein hat an der Oberfläche ein einzigartiges Muster an Histidinen, die mit Nickel-, Zink- oder Kupferionen Komplexe ausbilden können. *Mallik et al.* stellten Cu^{2+} -Komplexe mit Disäuren her und testeten ihre Affinität zu His-reichen Proteinen.^[13]

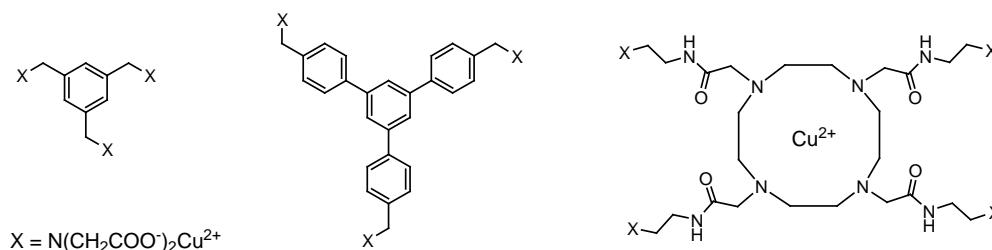


Abb. 1.5: Kupferkomplexe, die sich in Größe, Flexibilität und Anzahl gebundener Cu^{2+} -Ionen unterscheiden.^[13]

Je nach Oberflächenstruktur der untersuchten Proteine konnten gute Affinitäten mit verschiedenen Metallkomplexen, die sich in Größe, Flexibilität und Anzahl gebundener Cu^{2+} -Ionen unterscheiden, beobachtet werden.

Von *Hamachi et al.* beschriebene $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ -Rezeptoren zeigen eine selektive Bindung an Cytochrom C(CytC).^[14]

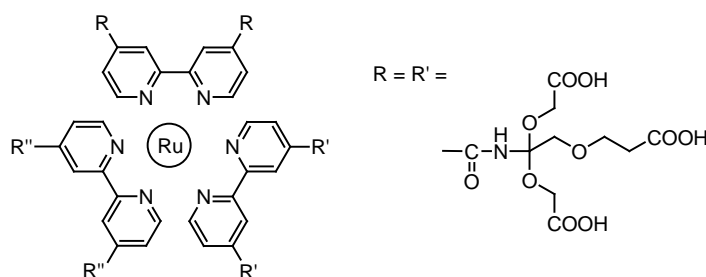


Abb. 1.6: $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ -basierter polyanionischer Komplex
($\text{R} = \text{R}' =$ verzweigtes Carboxylat, $\text{R}'' = \text{H}$).^[14]

Ruthenium Komplexe mit asymmetrisch funktionalisierten Tris-Bipyridinen können durch Koordination an der Oberfläche von CytC gebunden werden. Der in Abb. 1.6 dargestellte Komplex zeigte gute Affinitäten, er kann darüber hinaus den Redoxzustand des CytC photoinduziert gezielt beeinflussen und die enzymatische Aktivität kontrollieren.

Transmembranständige Kaliumkanäle sind aus vier Untereinheiten aufgebaut, die in ihrer Mitte eine Pore für Kaliumionen bilden. Vierfach symmetrische Moleküle, die den natürlichen Toxinen dieser Kanäle nachempfunden sind, wurden von *Trauner et al.* entwickelt.^[15]

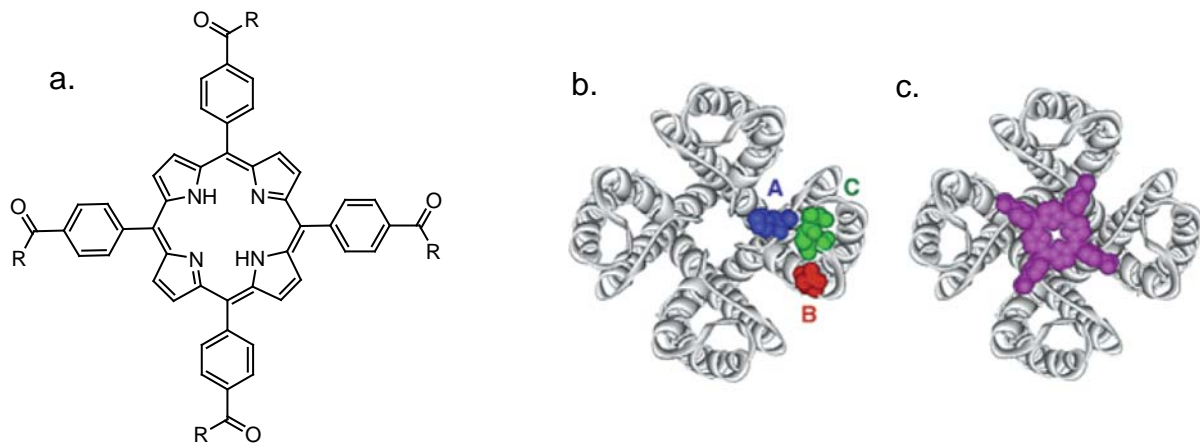


Abb. 1.7: **a.** Struktur der wasserlöslichen Tetraphenylporphyrin-Derivate (R: Aminosäure, Peptid, Alkohol, Amin); **b.** Kristallstruktur des Kaliumkanals KcsA; **c.** Kristallstruktur des Kaliumkanals KcsA mit überlagertem Tetraphenylporphyrin. ^[15]

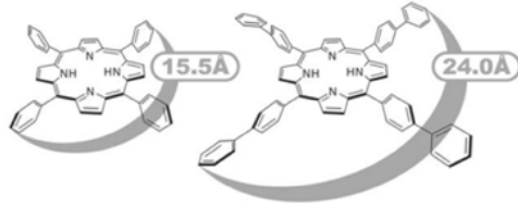
Diese symmetrischen, wasserlöslichen Tetraphenylporphyrine interagieren mit allen vier Untereinheiten der Kaliumkanäle gleichzeitig und zeigen einen starken polyvalenten Effekt mit nanomolaren Affinitäten. Durch die Bindung des Porphyrinderivats wird die Pore verschlossen und der Zugang der Kaliumionen blockiert. Abhängig von der Funktionalisierung der Porphyrine können Kaliumkanäle unterschieden werden, im Idealfall sogar ihre funktionellen Zustände erkannt werden.

Ein ähnliches System verwenden *Hamilton et al.* bei der Bindung von CytC. ^[16]

Die Kontaktfläche von CytC an Cytochrome-c-Oxidase weist eine charakteristische Anordnung einer hydrophoben Domäne mit einem Ring aus polaren, basischen Aminosäuren auf. Der künstliche Rezeptor für diese Oberflächenstruktur trägt daher einen hydrophoben Kern mit negativ geladenen Seitenketten. Durch das Vergrößern des Rezeptors von dem 15.5 Å großen Tetraphenylporphyrin zum 24.0 Å großen Tetrabiphenylporphyrin konnte eine bessere Mimetik des natürlichen Bindungsmotivs

erzielt werden. Es konnten Bindungskonstanten bis in den subnanomolaren Bereich bestimmt werden.

a.



b.

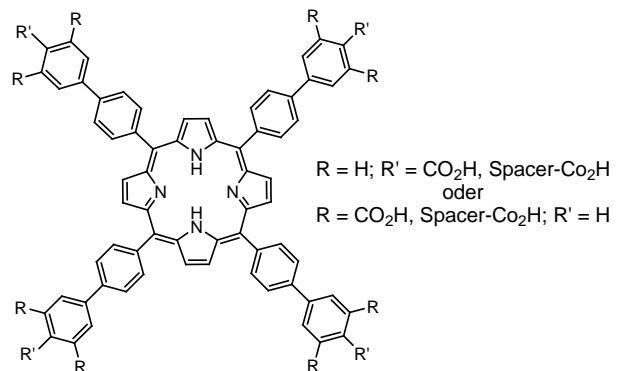


Abb. 1.8: **a.** Größenvergleich zwischen Tetraphenylporphyrin und Tetrabiphenylporphyrin;
b. funktionalisiertes Tetrabiphenylporphyrin.^[16]

In einem weiteren Ansatz wurden mit cyclischen Peptiden verknüpfte Calix[4]arene als synthetische Antikörpermimetika hergestellt und ihre Affinität gegenüber CytC bestimmt.^[17]

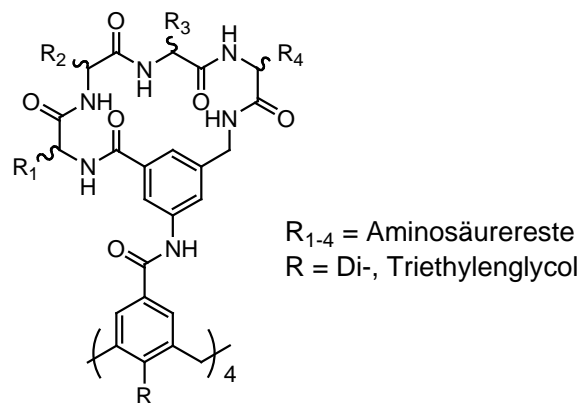


Abb. 1.9: Calix[4]arene mit cyclischem Peptid verknüpft.^[17]

Diese Anordnung imitiert die Rolle hypervariabler Loops in Antikörpern und stellt eine definierte Bindungsregion für eine komplementäre Proteinoberfläche dar. Die Bindung des Rezeptors an CytC erfolgt in der Nähe der Häm-Region und kann die Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) inhibieren.

Tampé et al. verwendeten Metall-Chelatoren zur reversiblen Bindung Histidin getagter Proteine.

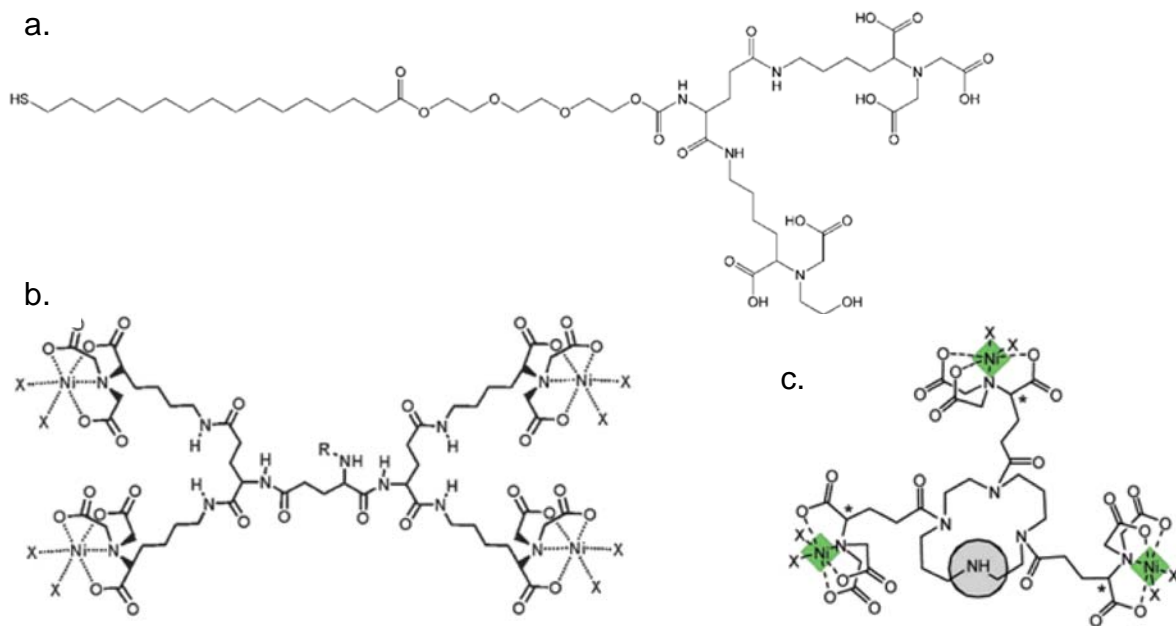


Abb. 1.10: Multivalente Ni^{2+} -chelatisierende Rezeptoren für His-getagte Proteine:
a. Thiol zur Immobilisierung auf Oberflächen^[18]; **b.** Rezeptor für His-getagtes 20S-Proteasom^[19]; **c.** fluoreszierender Rezeptor zu reversiblen Fluoreszenzmarkierung His-getagter Proteine (grau: Fluoreszenzfarbstoff)^[20].

Multivalente metallchelatisierende Thiole (Abb. 1.10. a.), die stabile Bindungen zu His-getagten Proteinen ausbilden, können auf Goldoberflächen biokompatible SAM's (self-assembled monolayer) ausbilden. Proteine und Proteinkomplexe können unter Erhaltung ihrer Aktivität untersucht und unter milden Bedingungen von der Oberfläche entfernt werden.^[18]

In eukaryotischen Zellen ist das Proteasom verantwortlich für den Abbau beschädigter, überproduzierter und unerwünschter Proteine bei der Transkription, der Signalübertragung und der Apoptose. Der in Abb. 1.10 b. gezeigte Rezeptor kann ein His-getagtes 20S Proteasom spezifisch und reversibel binden und seine Aktivität regulieren.^[19]

Eine spezifische und stabile nichtkovalente Fluoreszenzmarkierung His-getagter Proteine konnte durch den in Abb. 1.10 c. dargestellten Rezeptor erreicht werden. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe konnten mit einer drei NTA-Reste (Nitrilotriacetat) tragenden Erkennungseinheit verknüpft werden. Die hohe Selektivität

dieser Rezeptoren gegenüber Histidinen ermöglichte die Markierung von Proteinen mit einer großen Zahl an Histidinen in Zelllysaten und auf der Oberfläche lebender Zellen.^[20]

Nanopartikel sind vielversprechende Rezeptoren für die Erkennung von Proteinoberflächen. Ihre Größe kann auf die Größe ihrer Zielmoleküle abgestimmt werden; ihre Oberfläche kann auf die Oberfläche des Zielmoleküls abgestimmt funktionalisiert werden; der Kern kann elektronische, magnetische oder fluoreszierende Eigenschaften haben.

Rotello et al. nutzten die Eigenschaften von Nanopartikeln zur Oberflächenenerkennung von Biomolekülen.^[21]

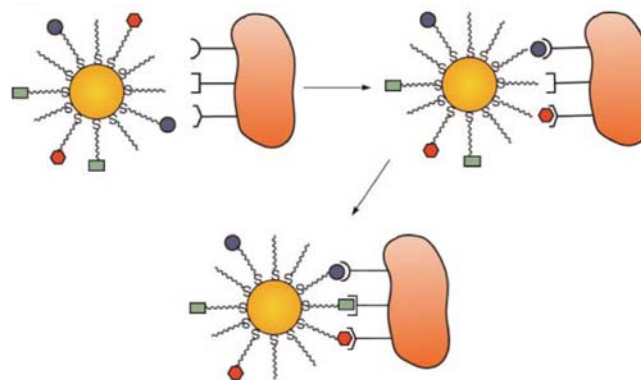


Abb. 1.11: Schematische Darstellung eines funktionalisierten Nanopartikels.^[21]

Um ein flexibles, auf äußere Einflüsse reagierendes System zu erhalten, kann die Bewegungsfreiheit von Thiolen auf der Oberfläche genutzt werden. Durch Zugabe eines Biomoleküls ordnen sich die funktionellen Einheiten des Nanopartikels in optimaler Ausrichtung an und maximieren damit die Bindungsenthalpie.

Da das aktive Zentrum von Chymotrypsin von basischen Aminosäuren umgeben ist, wurden zur Erkennung carboxylatfunktionalisierte Goldnanopartikel untersucht.

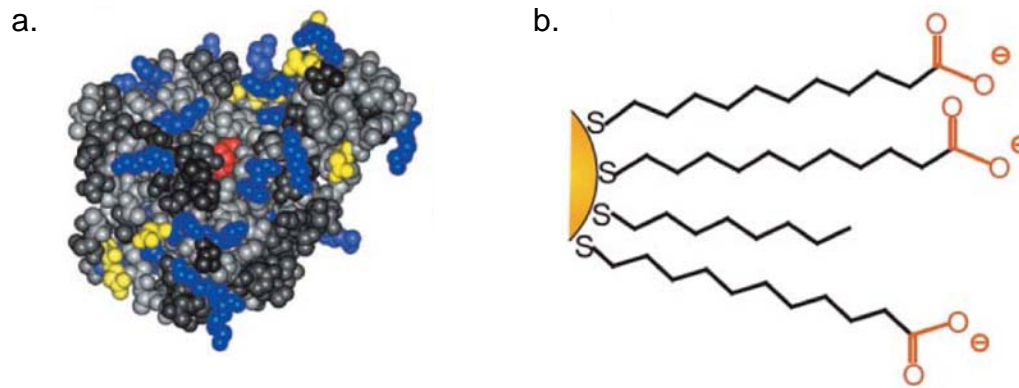


Abb. 1.12: **a.** Das aktive Zentrum (rot) des Chymotrypsins ist von basischen Aminosäuren umgeben (blau); **b.** Struktur des carboxylatfunktionalisierten Goldnanopartikels.^[21]

Es wurde eine starke Bindungskonstante im nanomolaren Bereich ermittelt und eine effektive Inhibierung beobachtet. Der Vergleich mit β -Galaktosidase und Elastase zeigte eine spezifische Bindung zu Chymotrypsin.

Neben Proteinen konnten auch andere Biomoleküle von Nanopartikeln gebunden werden: DNA durch ammoniumfunktionalisierte Nanopartikel, Lectin durch Funktionalisieren der Nanopartikel mit Laktose, Bakterien durch Vancomycin.

1.2. Molekular geprägte Polymere

Ein nicht-biologischer Ansatz besteht im molekularen Prägen (Molecular Imprinting), dem Aufbau spezifischer Polymere (MIPs) mit hoher Selektivität für kleinere Peptide, die künstlichen Antikörpern sehr nahe kommen.

Hierbei liegen allerdings die Bedingungen zwischen struktureller Stabilität der Biomoleküle und des Imprintings bezüglich des pH-Werts, der Temperatur, Ionenstärke oder des Lösungsmittels oft weit auseinander.^{[22], [23], [24]}

Erste vielversprechende Ansätze lösen diese Probleme:

Shea *et al.* ^[25] erzeugten hochselektive Polymere, indem sie einen Sequenzausschnitt von neun Aminosäuren aus dem zu bindenden Protein auf einer Oberfläche kovalent banden und dann mit einer Monomer-Lösung aus Acrylamid und *N,N'*Ethylenbisacrylamid inkubierten. Die Polymerisation erfolgte photochemisch.

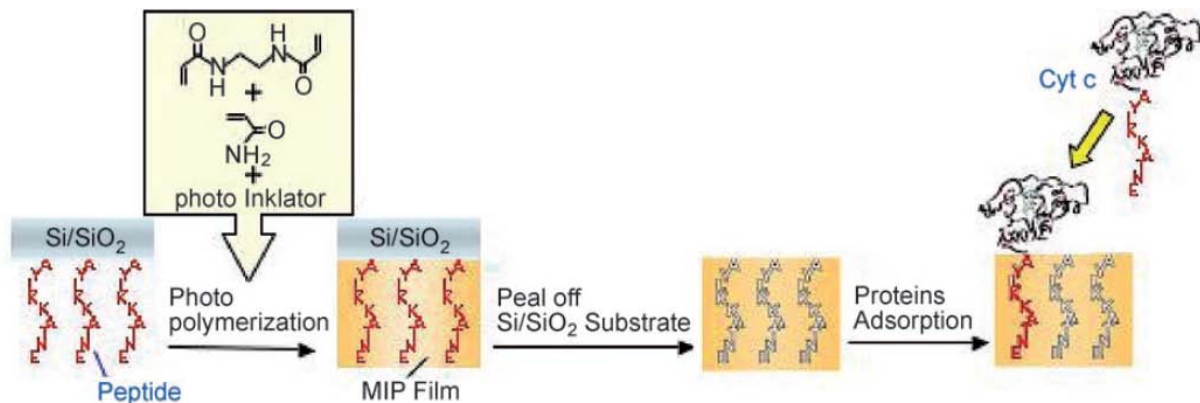


Abb. 1.13: Molekulares Prägen von Polymeren mit Proteinepitopen ^[25].

Das C-terminale Nonapeptid-Epitop ist mit der N-terminalen Aminosäure kovalent mit der Oberfläche verknüpft.

Auf diese Weise konnten einfache aber hochselektive Polymere hergestellt werden, die komplementär zur Proteinoberfläche sind.

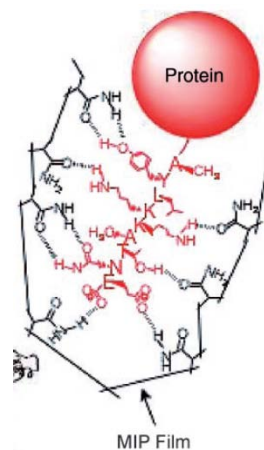


Abb. 1.14: Bindung des Proteins durch Erkennung des C-terminalen Nonapeptids von dem MIP. ^[25]

Die C-terminale Sequenz des Proteins wird in der sequenzspezifischen Bindungstasche des Polymers gebunden. Die Bindung wird durch Kooperation schwacher Einzelbindungen verstärkt.

Zur Lysozym-Erkennung entwickelten *Sakai et al.* ^[26] mit Polymeren beschichtete, lysozymselektive Silica-Kügelchen. Dazu wurden Acrylamid und *N,N'*-Dimethylaminopropylacrylamid mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in Phosphatpuffer mit Lysozym in Anwesenheit der Silica-Kügelchen polymerisiert. Es entstanden polymerbeschichtete Kügelchen mit lysozymspezifischer Bindungsregion.

Kulkarni et al. ^[27] polymerisierten einen Komplex aus Trypsin und *para*-Aminobenzamidin mit Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid zu einem selektiven Trypsin-Binder.

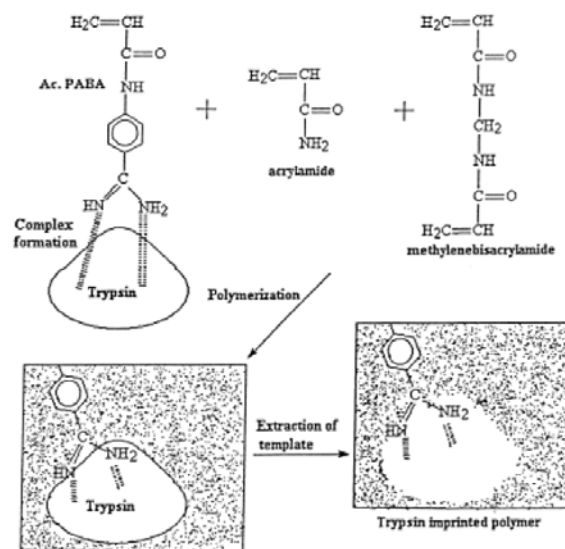


Abb. 1.15: Herstellung eines molekulär geprägten polymeren Trypsin-Rezeptors. ^[27]

p-Aminobenzamidin ist ein starker Trypsin-Inhibitor und wurde als Trypsin-selektives Comonomer polymerisiert. Nach dem Entfernen des Trypsin-Templats entstand ein selektives Polymer, das Trypsin auch in Proteinmischungen erkennt. Auf diese Weise konnte sowohl eine Proteinmischung von Trypsin-Resten befreit als auch eine neue Reinigungsmethode für Trypsin entwickelt werden.

Auch *Haupt et al.* ^[28] verwendeten ein *p*-Aminobenzamidin-Monomer zur Herstellung eines wasserlöslichen, molekulär geprägten Mikrogels als spezifischen Trypsin-Inhibitor.

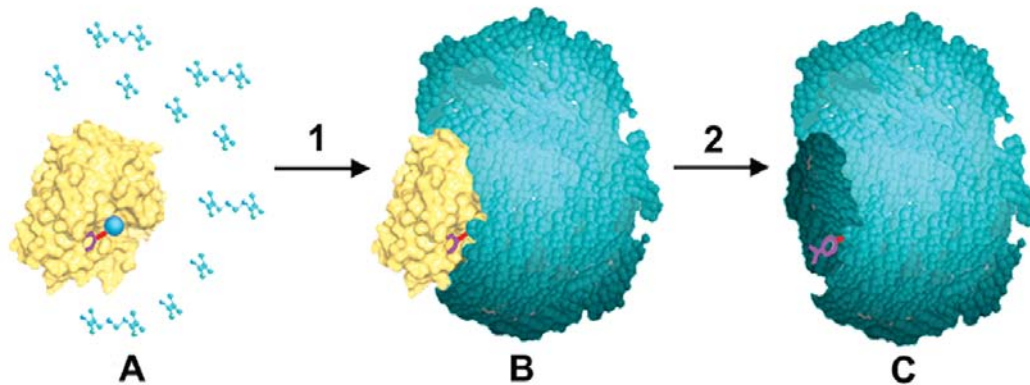


Abb. 1.16: Schematische Darstellung der molekularen Prägung des Trypsins. ^[28]

Das gelöste Trypsin (gelb) wird mit dem *p*-Aminobenzamidin-Monomer und den Comonomeren versetzt (**A**). Die Polymerisation wird durchgeführt (**1**), es entsteht der Polymer-Enzym-Komplex **B**. Das Enzym wird entfernt (**2**) und es wird das geprägte Microgel **C** als spezifischer Inhibitor erhalten. Dieser Inhibitor kann das Trypsin drei Größenordnungen besser inhibieren als *p*-Aminobenzamidin.

Die Hyperphosphorylierung am Tyrosin wird häufig im Tumorphotom beobachtet. Daher können Phosphotyrosin (pTyr)-Binder als Tumormarker in Diagnostik und Therapie verwendet werden. Die Bindung von pTyr-Proteinen wird meist durch pTyr-spezifische Antikörper realisiert. Eine Alternative sind die von *Sellergren et al.* entwickelten, selektiven geprägten Polymere ^[29].

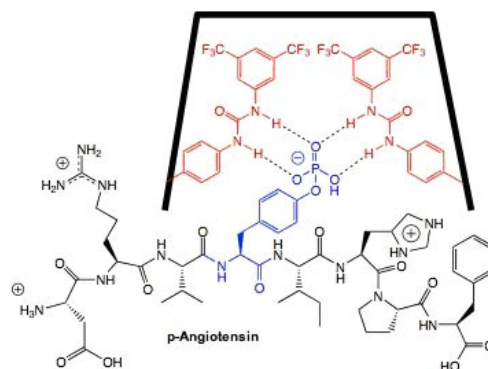


Abb. 1.17: Bindung von pTyr-Resten aus Proteinen oder Peptiden in einer pTyr-Bindungstasche. ^[29]

Die Bindungstasche beinhaltet zwei Harnstoffliganden, die an einem pTyr-Templat vororientiert und anschließend mit Methacrylamid und Ethylenglycoldimethacrylat polymerisiert werden.

In einer Kooperation von *Ulbricht* und *Schrader* entstanden durch photo-initiierte Graftcopolymerisation selektive Copolymere auf PET-Membranen. ^[30]

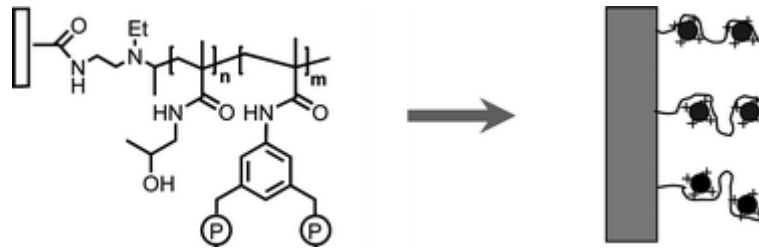


Abb. 1.18: Proteinerkennung mit Arg-selektiven Copolymeren auf Membranen. ^[30]

Die Membranen zeigten eine starke Bindung von argininreichem Lysozym. Auch in Mischungen aus argininreichem Lysozym und lysinreichem Cytochrom C, die sich in Molekulargewicht und pI stark ähneln, wurde eine selektive Bindung von Lysozym beobachtet.

1.3. Oberflächenerkennung mit Bisphosphonatpinzetten

Im Arbeitskreis *Schrader* wurden Rezeptoren zur Bindung und Erkennung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen entwickelt, die auch in Wasser starke Bindungen ausbilden.

Zunächst wurde nachgewiesen, dass *m*-Xylylenbisphosphonat-Pinzetten starke Komplexe mit Amidinen und Guanidinen über Wasserstoff-Brücken, π -Kation-Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden können. ^[31]

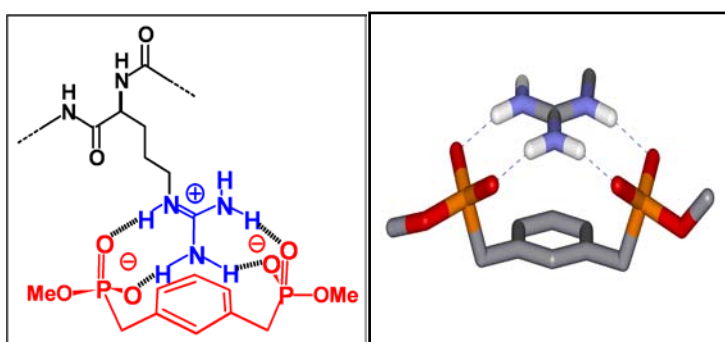
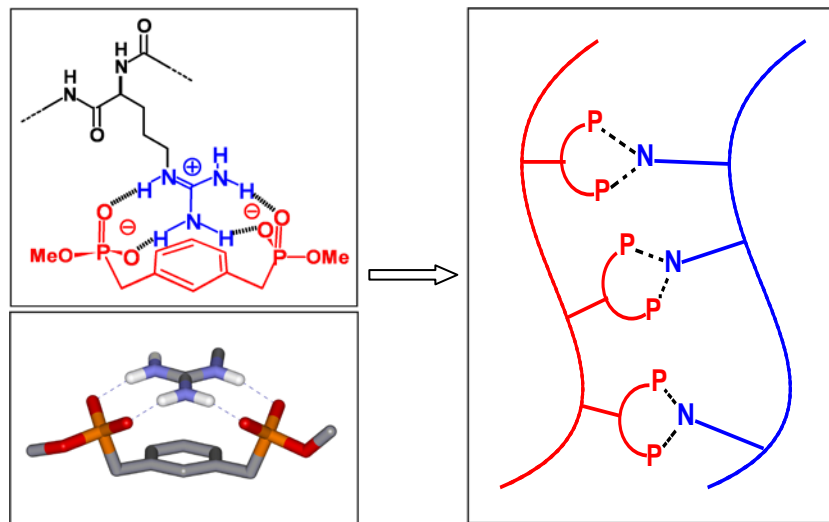


Abb. 1.19: Komplexierung eines Guanidinium-Kations von einer *m*-Xylylenbisphosphonat-Pinzette.

Die Bindungskonstante eines solchen Komplexes liegt in DMSO bei ca. $8.6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, nimmt jedoch in Wasser stark ab und liegt mit ca. 100 M^{-1} im kaum messbaren Bereich. ^[32]

In Anlehnung an das in der Natur vorkommende Prinzip der Multivalenz, nach dem die Bindungskonstante eines Rezeptors durch Vervielfältigung der Bindungsmotive die Summe der Bindungskonstanten der einzelnen Bindungsmotive deutlich übersteigt, wurden Strategien zur Bindungsvervielfältigung entwickelt.

Abb. 1.20: Prinzip der Multivalenz. ^[33]

Denkbar sind Dendrimere, Oligomere mit Peptidrückgrat und Polymere. Im Folgenden wird allein der Polymeransatz berücksichtigt.

Die Polymerisation des Bisphosphonat-Monomers mit fluoreszierenden Monomeren ermöglichte die Bestimmung der Bindungskonstanten zu Arginin, Oligo- und Polyargininen in Wasser. Wird mit Arginin noch eine Bindungskonstante von 100 M^{-1} bestimmt, so liegt sie mit Hexaarginin bereits bei 10^7 M^{-1} . ^[34]

In Proteinen wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Je größer der Anteil an positiv geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins ist, desto stärker ist auch die Bindung zu Bisphosphonatpolymeren. Proteinase K mit einem pI von 7.7 wird mit einer Bindungskonstante von $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ deutlich schlechter gebunden als Lysozym (pI 9.1) mit $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Die Bisphosphonat-Pinzette zeigt auch eine Selektivität für Arginin, das eine guanidinfunktionalisierte Seitenkette trägt, gegenüber Lysin mit einer Aminogruppe. Der Vergleich zwischen argininreichem Lysozym ($4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) und lysinreichem Cytochrom C ($2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), die sich in pI und Molekulargewicht stark ähneln, macht diese Selektivität deutlich. ^[35]

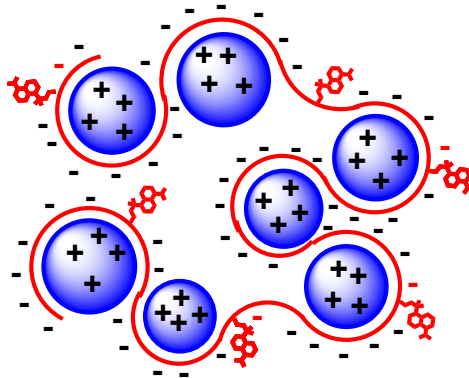


Abb. 1.21: Modell eines negativ geladenen Polymers, das sich um positiv geladene Proteine windet. ^[35]

Diese Bisphosphonat-Polymere unterscheiden jedoch argininreiche Proteine nicht. Um dies realisieren zu können, wurden neue Monomere synthetisiert, die die Eigenschaften der Polymere durch Copolymerisation verändern.

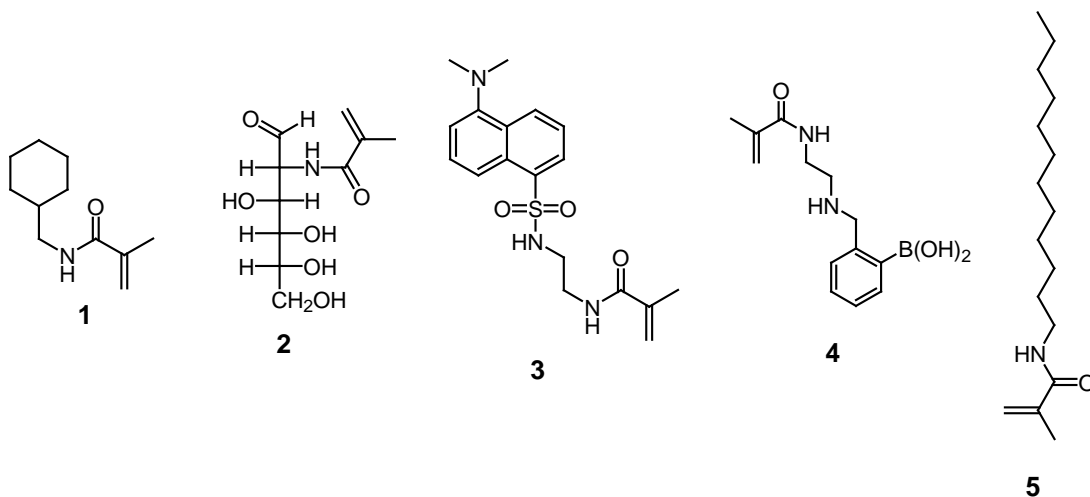


Abb. 1.22: Monomere von Koch ^[36] und Sun ^[37].

Je nach eingebauten Monomeren und je nach Einbauverhältnis kommt es tatsächlich zu unterschiedlichen Bindungskonstanten mit unterschiedlichen Proteinen. ^[36]

Die Bedeutung dieser Bindungskonstanten lässt sich über den Einfluss der Polymere auf ein Enzym überprüfen.

Mit Lysozym konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung des Polymers auf der Oberfläche der Zugang zum aktiven Zentrum versperrt und die Aktivität des Enzyms inhibiert werden kann. Dabei handelt es sich um eine nicht-kompetitive Inhibierung, das Polymer bindet reversibel auf der Oberfläche und durch Zerstören des Polymer-Lysozym-Komplexes kann die Enzymaktivität wieder hergestellt werden. ^[38]

1.4. Grundlagen und Funktionsstörungen des Verdauungssystems

Zum besseren Verständnis der Funktionen der Verdauungsenzyme wird zunächst ein kurzer Überblick über Struktur, Anatomie und Fehlfunktionen des Pankreas gegeben.

1.4.1. Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse ist ein ca. 100 g schweres, 15-20 cm langes, im Oberbauch liegendes Drüsenorgan der Wirbeltiere. Die im Pankreas gebildeten Verdauungsenzyme werden über die exokrine Drüsenfunktion an den Dünndarm ausgeschüttet und können dort Proteine, Fette und Zucker spalten. Desweiteren werden in der Bauchspeicheldrüse Hormone gebildet und ins Blut abgegeben. Die Regulation des Blutzuckerspiegels und der Verdauungsprozesse erfolgt über diesen endokrinen Anteil. ^[39]

Das exokrine Pankreas produziert täglich 2 L eines Sekrets, das Elektrolyte und Verdauungsenzyme enthält. Die meist als inaktive Vorläuferproteine produzierten Enzyme werden bei Bedarf an den Dünndarm abgegeben und dort durch hydrolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt. Als Ausnahme seien hier die Pankreaslipase und die α -Amylase genannt. ^[40]

Erkrankungen des Pankreas können durch Überproduktion bzw. zu frühe Aktivierung der Verdauungsenzyme (Pankreatitis) auftreten, durch Funktionsausfall des exokrinen Teils (Pankreasinsuffizienz) sowie durch Störungen des endokrinen Teils (Diabetes mellitus).

1.4.2. Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis ist definiert durch drei wesentliche Aspekte: die klinischen Symptome, die äußeren Schädigungen des Pankreas sowie des Verlust der

Funktion. Diagnostiziert wird akute Pankreatitis durch die Kombination akuter abdominaler Schmerzen und erhöhter pankreasspezifischer Mengen an Verdauungsenzymen in Blut und Urin.^[41]

In etwa 85 % der Fälle verläuft eine akute Pankreatitis harmlos ohne bleibende Schäden zu hinterlassen (ödematöse Pankreatitis). Nach wenigen Tagen verschwinden die klinischen Symptome und die Funktion der Bauchspeicheldrüse wird vollständig zurückerlangt.

Einen schwerwiegenderen Verlauf nimmt die nekrotisierende Pankreatitis, die mit der Störung mindestens eines Organs (Lunge, Niere, kardiovaskuläres System) bis hin zum Multiorganversagen einhergeht. Die Erkrankung endet in mehr als 50 % der Fälle mit bleibender Pankreasinsuffizienz.

Die Therapie der akuten Pankreatitis stützt sich auf die Behandlung der Symptome. Spezifische Therapieansätze in Übereinstimmung mit der Krankheitsursache blieben bislang erfolglos. Diese beinhalten Protease-Inhibitoren oder Behandlungen mit Hormonen und anderen Agenzien, die die Produktion des Pankreassekrets unterdrücken können.^[41]

Tab. 1.1: Spezifische Therapieansätze zur Behandlung akuter Pankreatitis.^[41]

	Präparat	klinische Anwendung
Protease-Inhibitoren	Aprotinin (Trasylol®)	nicht etabliert
	Gabexat-Mesylat (Foy®)	nicht etabliert
Hormone / Inhibitoren der Pankreassekretion	Glucagon	nicht etabliert
	Calcitonin	nicht etabliert
	Atropin	nicht etabliert
	Somatostatin	nicht etabliert
	Octreotid (Sandostatin®)	nicht etabliert
andere	PAF-Antagonist (Lexipafant®)	nicht etabliert

Die Gabe der Protease-Inhibitoren Aprotinin und Gabexat-Mesylat (GM) wurde zunächst in Tierversuchen getestet und zeigte einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Die Inhibitoren wurden jedoch verabreicht, bevor die akute Pankreatitis induziert wurde. Bei Patienten kann die Gabe erst nach Beginn der Krankheit erfolgen, die Wirkung der Medikamente konnte nicht nachgewiesen

werden. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund der geringen Halbwertszeit von GM und dem schwachen GM-Trypsin-Komplex die interessanten perfundierten Pankreasnekrosen durch die Protease-Inhibitoren nicht erreicht werden.^[42]

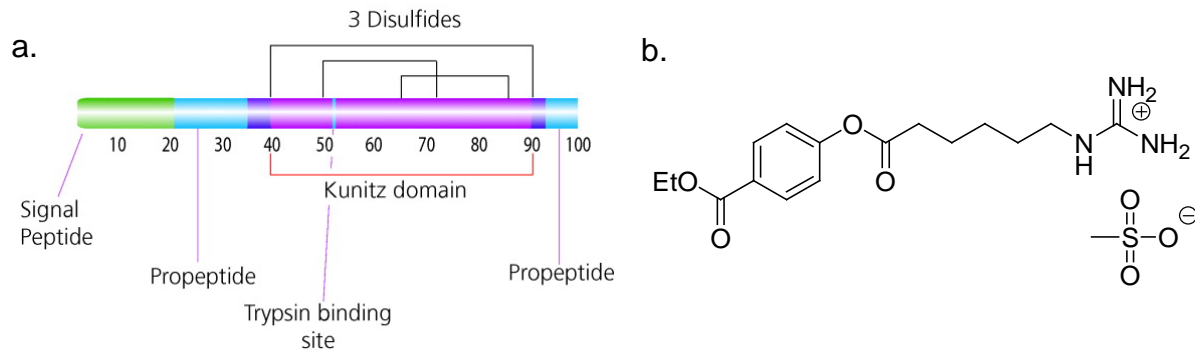


Abb. 1.23: Strukturen von **a. Aprotinin**, **b. Gabexat-Mesylat**.

Die Anwendung antisekretorischer Hormone wie Aprotinin, Somatostatin und das synthetische Analogon Octreotid war einige Zeit verbreitet. Die Sekretion des gesamten Magen-Darm-Trakts kann gehemmt werden. Als unerwünschte Nebenwirkung trat jedoch die Reduktion der gastrointestinalen Durchblutung und der Produktion von Insulin und Glucagon auf. Klinische Studien zeigten für Octreotid und den Placebo hinsichtlich Überlebensrate sowie klinischen und biochemischen Parametern die gleichen Ergebnisse.^[43]

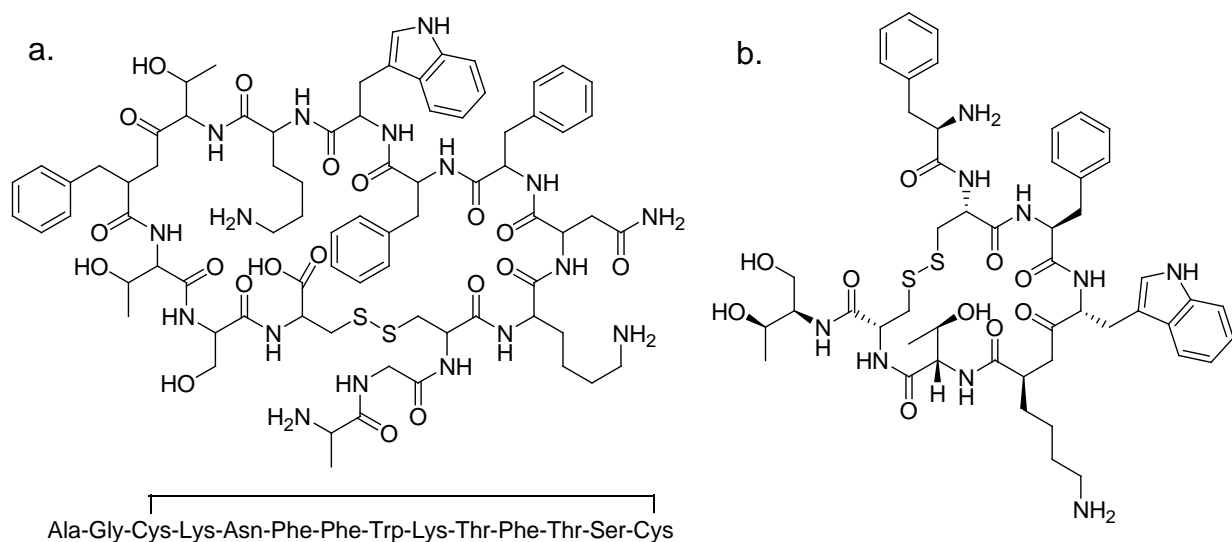


Abb. 1.24: Strukturen von **a. Somatostatin**, **b. Octreotid**.

Als selektive Protease-Hemmer konnten diverse Naturstoffe identifiziert werden:

Cyanopeptoline sind cyclische Strukturen, die aus fünf Aminosäuren und einer Ahp-Gruppe (3-Amino-6-hydroxy-2-oxo-piperidin) aufgebaut sind. Hierzu zählt beispielsweise der Elastase-Inhibitor Scyptolin A (vgl. Abb. 1.25).^[44, 45] Bei der Verwendung dieser Moleküle in Medikamenten ist die Toxizität problematisch.

Auch andere cyclische peptidische Strukturen wie in Mikroviridinen^[46-48] oder Anabaenopeptin A^[49] zeigen starke Selektivitäten gegenüber einzelnen Proteasen.

Die Klasse der Aeruginosine^[50] beschreibt lineare Proteasehemmstoffe. Gemeinsam ist den Aeruginosinen eine zentrale Hydroxy- (oder Dihydroxy-)octahydroindol-carboxamid-Kerneinheit, an deren Carboxy- und Aminoende ungewöhnliche Aminosäuren zu einem linearen Peptid aufgereiht sind. Für ihre Serinprotease-Inhibitoraktivität sind eine argininmimetische Untereinheit und zwei hydrophobe Reste verantwortlich.

Auch die von *Kaiser* untersuchten teilweise peptidischen Naturstoffe Syringolin A und B und Glidobactin A zeigten inhibitorische Effekte auf proteolytische Enzyme.^[51, 52]

Die Veränderung dieser Naturstoffe durch Variation der an der Bindung beteiligten Aminosäureseitenketten könnte zu weiteren selektiven Proteaseinhibitoren führen.

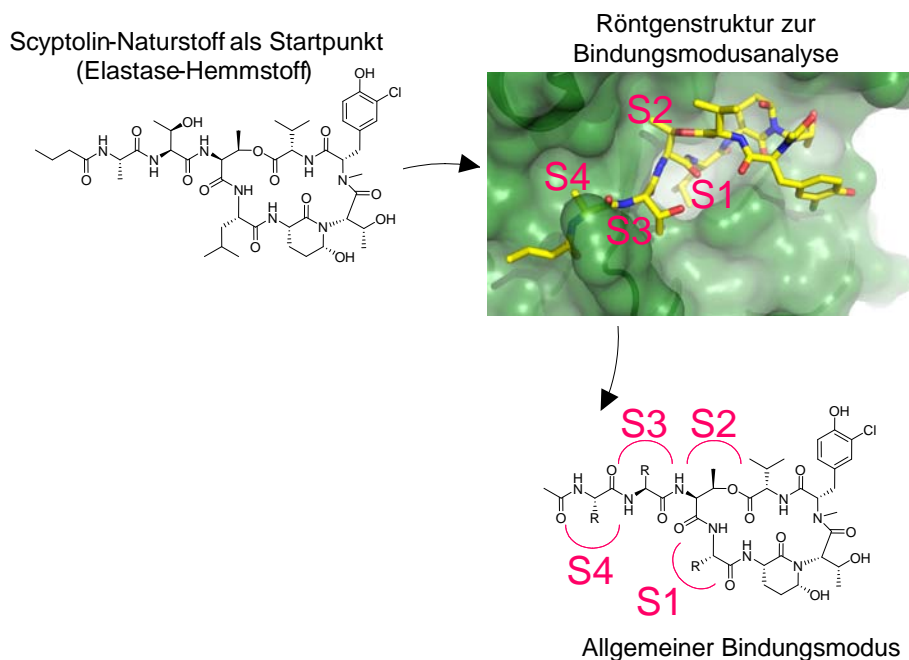


Abb. 1.25: Die Veränderung der Leitstruktur kann durch Anpassung der Aminosäureseitenketten an die Bindungstaschen S1-S4 des zu inhibierenden Enzyms zu selektiven Protease-Inhibitoren führen.

Tab. 1.2: Einige selektive Protease-Inhibitoren.

Inhibitor	Gehemmte Protease
Boc-AAA-NHO-Bz ^[53]	Elastase
MeOSuc-AAPA-CMK ^[54, 55]	Elastase
MeOSuc-AAPV-CMK ^[56]	Elastase
<i>N</i> -(<i>o</i> -(<i>p</i> -Pivaloyloxybenzyl)-sulfonylaminobenzoyl)glycin ^[57]	Elastase
Scyptolin A ^[44, 45]	Elastase
Z-FG-NHO-Bz ^[58]	Cathepsin
Boc-VF-NHO-Bz- <i>p</i> Cl ^[59]	Cathepsin
Pepstatin A ^[60, 61]	Cathepsin
<i>N</i> -Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO ^[62]	Calpain
<i>N</i> -Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO ^[63]	Calpain
Z-Val-Phe-CHO ^[64]	Calpain
Z-Leu-Leu-Tyr-CH ₂ F ^[65]	Calpain
Mu-Val-HPh-CH ₂ F (Mu = morpholinoureidyl; HPh = homophenylalanyl) ^[66]	Calpain
4-Fluorophenylsulfonyl-Val-Leu-CHO ^[67]	Calpain
Antithrombin III ^[68]	Thrombin
Hirudin ^[69]	Thrombin
Benzamidin	Trypsin
Chymostatin	Chymotrypsin
Cyanopeptolin 963A ^[70]	Chymotrypsin
Syringolin A ^[52]	Proteasom
Glidobactin A ^[51]	Proteasom

In der Tabelle 1.2 sind einige selektive Protease-Hemmer zusammengestellt. Es sind meist Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete peptidische Strukturen, die die Enzyme durch Bindung im aktiven Zentrum oder in der Substratbindungstasche inhibieren.

1.4.3. Ischämie und Reperfusionsschaden (IRS)

Ischämie bezeichnet die Minderdurchblutung oder den vorübergehenden Durchblutungsausfall von Organen oder Gewebe. Die Unterbrechung der Blutzufuhr eines jeden Gewebes führt zum Zelltod, wenn der Blutfluss nicht wiederhergestellt wird, bevor der Zellschaden irreversibel ist^[71]. Doch auch die Reperfusion stellt nicht nur die Wiederherstellung des Blutkreislaufs dar, sondern beinhaltet vielmehr eine aktive Antwort des Organismus auf die zuvor entstandenen Schäden^[72].

Die Theorie des Reperfusionsschadens postuliert, dass bei der Reperfusion „Faktoren“ in das der Ischämie ausgesetzte Gewebe eingebracht werden, welche durch die Ischämie geschädigte Zellen zusätzlich schädigen, so dass diese Zellen nicht mehr zur Regeneration fähig sind. Der Reperfusionsschaden ist also als die Summe schädlicher Einwirkungen während der Ischämiezeit und während der Reperfusion zu verstehen. Besonders im Grenzbereich zwischen reversibel und irreversibel geschädigten Zellen bestimmt der Reperfusionsschaden zusätzlich zu den Bedingungen der Ischämie das Ausmaß der Zellschädigung mit.^[73]

Die pathophysiologischen Vorgänge, die im Rahmen des IRS ablaufen, können bei fast allen Organen wie z.B. Herz^[74-77], Leber^[78, 79], Niere^[80, 81], Lunge^[82], Skelettmuskel^[83], Gehirn^[84] und Darm^[85] beobachtet werden.

Studien belegen, dass das Pankreas sehr empfindlich gegenüber Ischämie und Hypoperfusion ist^[86-88]. Ein IRS des Pankreas zeigt sich häufig durch eine Schädigung des Dünndarms als Komplikation nach chirurgischen Eingriffen wie kardiopulmonalem Bypass, abdominalen Aortenaneurysmen oder Pankreastransplantationen, aber auch bei hypovolemischem und septischem Schock. Beispielsweise kann eine Transplantation, die mit kompletter Ischämie verbunden ist, eine Pankreatitis auslösen, die auf eine Hypoperfusion zurückzuführen ist^[89, 90].

Histomorphologisch ist der IRS am Pankreas durch eine interstitielle und intrazelluläre Ödembildung gekennzeichnet. Auch der Übergang in eine nekrotisierende Form, die Fettgewebs- und Azinuszellnekrosen beinhaltet, wird durch den IRS begünstigt^[91]. Hinzu kommen intrapankreatische Trypsinogenaktivierung^[88],

Ausbildung von zytoplasmatischen Vakuolen^[92] und leukozytäre sowie erythrozythäre Infiltration des Pankreas^[88].

In den Azinuszellen des Pankreas reguliert zudem die neuronale NO-Synthase den Kalziumeinstrom. Diese synthetisiert während der Ischämie vermehrt NO, das die Guanylatzyklase in benachbarten Zellen aktiviert, indem sie GTP in cGMP umwandelt. Das führt zur Öffnung weiterer Kalium- und Calciumkanäle^[93]. Der hohe Calciumspiegel soll für die Aktivierung von ATPasen und Proteasen verantwortlich sein, die z.B. zur Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin und damit zur Induktion einer Pankreatitis führen^[88].

Oxidativer Stress, d.i. die vermehrte Generierung von Radikalen, ist eine wichtige Komponente des IRS. Gerade nach der Migration von Leukozyten in das Pankreasparenchym sind die Azinuszellen des Pankreas einem besonders starken oxidativem Stress ausgesetzt, da sie selbst unter Ischämiebedingungen eine verstärkte Radikalproduktion betreiben^[94], und migrierende Leukozyten auch verstärkt Radikale freisetzen^[88, 95]. Sauerstoffradikale können das Zytoskelett der Azinuszelle dahin gehend verändern, dass es zu einem Sekretionsblock der Zymogene kommt, der eine Trypsinogenaktivierung auslösen kann^[88, 96].

2. Aufgabenstellung

Durch Schock, Infarkt, herzchirurgische Eingriffe oder Transplantationen können Ischämie und Reperfusionsschäden (IRS) ausgelöst werden. IRS können akute Pankreatitis verursachen, die wiederum den Dünndarm schädigt.^[97-102]

Es ist bislang unklar, ob die Dünndarmschädigung aufgrund einer zu hohen Konzentration an Proteasen hervorgerufen wird, oder ob einzelne Enzyme maßgeblich verantwortlich sind. Ein gezielter therapeutischer Ansatz, der die Schäden verhindert oder zumindest minimiert, ist nicht verfügbar. Die bisher verwendeten Protease-Inhibitoren (z.B. Aprotinin) sind bezüglich einer definierten Protease nicht selektiv. Es ist deshalb wichtig, spezifische Proteasehemmer zu entwickeln, um die systemischen Reaktionen bei der Dünndarmschädigung infolge von IRS und die Rolle der verschiedenen Verdauungsenzyme erklären zu können.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, hochspezifische inhibierende Polymere für potentiell krankheitsrelevante Proteasen zu finden. Dabei sollte eine allgemeine Methode entwickelt werden, die sowohl die Synthese der Polymere als auch die Untersuchung ihrer Wechselwirkungen mit Enzymen im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht. Dies sollte in drei Phasen realisiert werden: der Synthese neuer spezifischer Haftmonomere, der Entwicklung einer neuen Polymerisationstechnik und dem Screening der Polymere gegenüber diversen Verdauungsenzymen.

Neben dem bereits bekannten BP-Monomer **6** für basische Aminosäuren werden weitere aminosäurespezifische Monomere für bisher nicht erkannte Aminosäureklassen benötigt. So existieren keine Monomere für saure und aromatische Aminosäuren sowie für Histidin.

Die im Arbeitskreis *Schrader* etablierte Polymerisationstechnik war durch eine effektivere mit geringeren Mengen an Monomeren, geringerem Aufarbeitungsaufwand und höheren Ausbeuten zu ersetzen. Es sollte eine kleine Bibliothek von Polymeren bereitgestellt werden, die neben den neu hergestellten Monomeren auch die in früheren Arbeiten entwickelten enthält.^[33, 37, 103] Die Verwendung des Dansyl-

Monomers sollte zur Ausbildung von π -Stapelwechselwirkungen in den Polymeren enthalten sein.

Es war ein Screeningverfahren zu entwickeln, das diese Polymere auf ihren inhibitorischen Einfluss gegenüber Verdauungsenzymen einfach untersuchen lässt. Die Untersuchung der Polymere direkt im Enzymassay mit Chymotrypsin, Trypsin, Cathepsin D, Pankreaslipase und Thrombin wurde angestrebt. Es sollte zum einen festgestellt werden, ob eine Inhibierung möglich ist, zum anderen sollte die Spezifität der Inhibierung untersucht werden. Thrombin als Blutgerinnungsfaktor durfte durch die Inhibitoren nicht in seiner Aktivität eingeschränkt werden.

Diese Vorgehensweise könnte zu verschiedenen enzyspezifischen Inhibitoren führen, die in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *de Groot* an kultivierten Zellen, isolierten Organen und *in vivo* an Tiermodellen getestet werden können.

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1. Monomere

Zur Oberflächenerkennung von Proteinen wird in der Arbeitsgruppe *Schrader* das Konzept der Kombination aminosäurespezifischer Monomere durch Polymerisation seit einigen Jahren verfolgt. Von *Renner*^[33, 34], *Koch*^[103] und *Sun*^[37] wurden bereits folgende Bindungsmotive etabliert:

Zur Erkennung unpolarer Aminosäuren wurden das Cyclohexyl-Monomer **1** und das Dodecyl-Monomer **5** hergestellt.

Das Glucose-Monomer **2** kann durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen polare Aminosäuren binden sowie die Wasserlöslichkeit der Polymere erhöhen.

Das elektronenarme aromatische System des Dansyl-Monomers **3** bildet π -Stapel-Wechselwirkungen zu aromatischen Aminosäuren aus. Es dient weiterhin als Fluoreszenzmarker für die Polymere.

Mit dem Boronsäure-Monomer **4** wurde ein spezifischer Binder für Serin und Threonin aber auch für *trans*-Diole, die beispielsweise in glycosylierten Proteinen vorliegen, gefunden.^[104, 105]

Zur Bindung basischer Aminosäuren wurde mit dem Bisphosphonat-Monomer **6** ein spezifischer Rezeptor entwickelt.

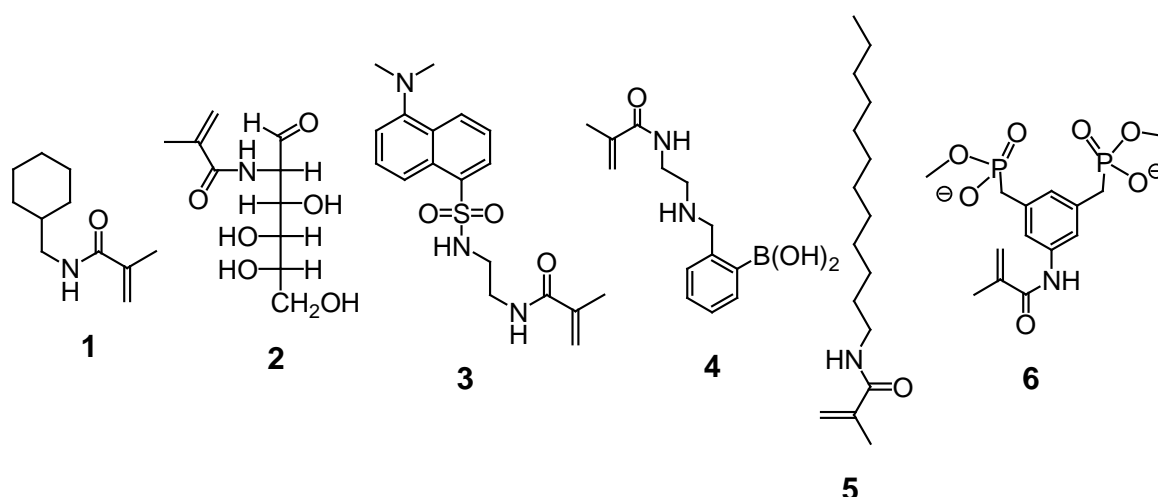


Abb. 3.1: In der Arbeit verwendete Monomere.

Die Kombination dieser Monomere kann jedoch lediglich zur Herstellung spezifischer Inhibitoren für basische und glycosylierte Enzyme führen. Die Bindung von Enzymen

mit carboxylat-, aromaten- und histidinreicher Oberfläche konnte bislang nicht realisiert werden. Spezifische Monomere als Rezeptoren für diese Aminosäureklassen wurden in Anlehnung an bereits bekannte starke Bindungsmotive synthetisiert:

Die Carboxylatgruppen saurer Aminosäuren können auf vielfältige Weise gebunden werden. In der Arbeitsgruppe Schrader wurde zunächst das einfache Ammonium-Monomer **10** hergestellt, dessen Carboxylatbindung in Wasser jedoch nicht messbar ist. ^[37] Einer der besten bekannten Carboxylatbinder wurde von *Schmuck* ^[106] entwickelt:

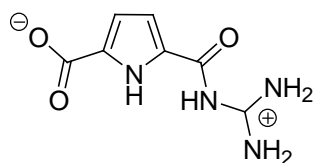


Abb. 3.2: Carboxylatbindungsmotiv von *Schmuck*. ^[106]

Das zentrale Pyrrol ist einseitig mit einer Acylguanidingruppe funktionalisiert und trägt desweiteren eine freie Carboxylatfunktion. Es kann durch Verknüpfung mit einem polymerisierbaren Rest in das potentiell stark bindende, carboxylatselektive Monomer **7** überführt werden.

Die Bindung von Histidin wird in biochemischen Anwendungen durch Komplexierung mit einer Trisäure über ein Ni^{2+} -Ion realisiert. Die monomere Form dieses Bindungsmotivs wurde bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe *Shea* verwendet. ^[107]

Als starke Bindungsmotive für Aromaten zeigten sich β -Cyclodextrin und seine Derivate.

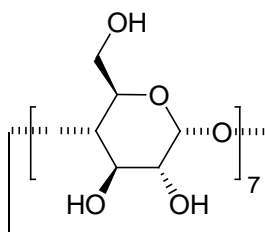


Abb. 3.3: β -Cyclodextrin.

Die Arbeitsgruppe Wenz konnte β -Cyclodextrin erfolgreich monosubstituieren. ^[108]
Die Herstellung des mit einem Monomer-Rest verknüpften β -Cyclodextrin-Monomers **9** sollte zu einem spezifischen Rezeptor für aromatische Aminosäuren führen.

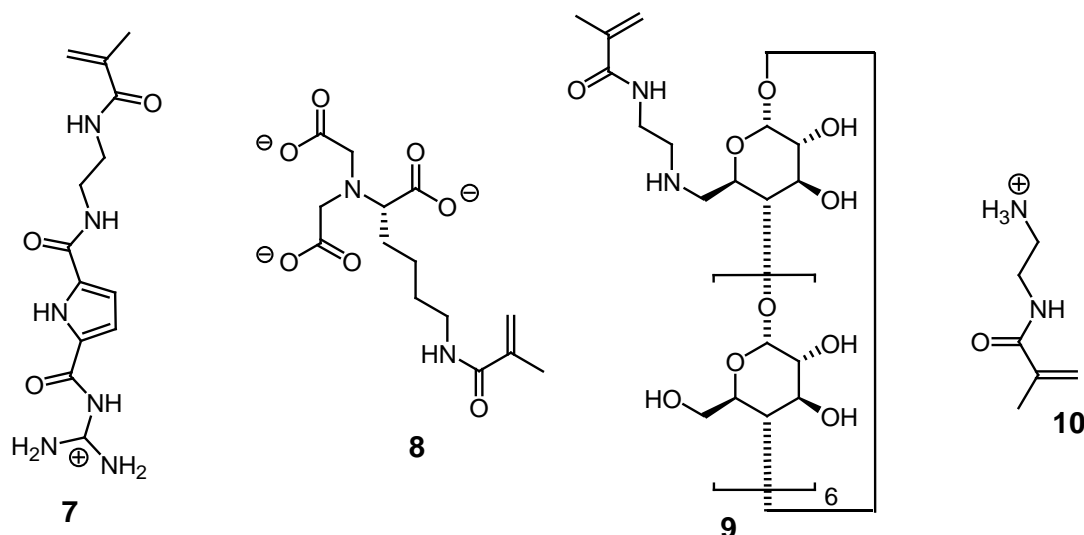


Abb. 3.4: Überblick über die synthetisierten Monomere **7-10**.

Neben der Herstellung der aminosäurespezifischen Haftmonomere wurde das Konzept der Verstärkung der Enzyminhibierung durch zusätzliche Monomere verfolgt, die die natürlichen Substrate nachahmen. Diese Monomere sollen die S_1 -Bindungstasche besetzen und so den Zugang der Substrate verhindern. Strukturelle Voraussetzung an die aminosäurebasierten Monomere ist ein C-Terminus, der keine Peptidbindung trägt, die dem Enzym als Substrat dienen könnte. Entsprechend darf das Substratmimetikum der Lipase keine Esterbindungen tragen.

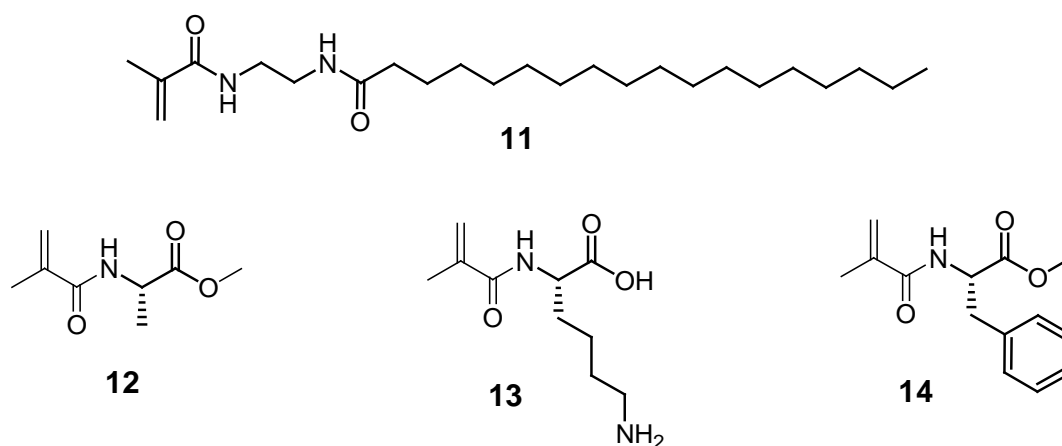


Abb. 3.5: Substratmimetische Monomere.

3.1.1. Erkennung basischer Aminosäuren

Viele im Pankreas produzierte Verdauungsenzyme besitzen einen basischen oder neutralen isoelektrischen Punkt. Auf ihrer Oberfläche befinden sich die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Zur Bindung dieser Seitenketten, also der Komplexierung von Ammonium- und Guanidinium-Ionen, wird ein spezifisches Haftmonomer benötigt.

Die von Schrader^[32-34] entwickelte Bisphosphonat-Pinzette (BP) wird als Monomer zur Komplexierung von Guanidinium-Ionen durch Wasserstoffbrücken, π -Kation- und elektrostatische Wechselwirkungen verwendet. Durch die Wechselwirkung von Arginin-Resten auf der Oberfläche von Enzymen und Bisphosphonat-Resten in Copolymeren können basische Proteine von bisphosphonathaltigen Polymeren erkannt und gebunden werden.

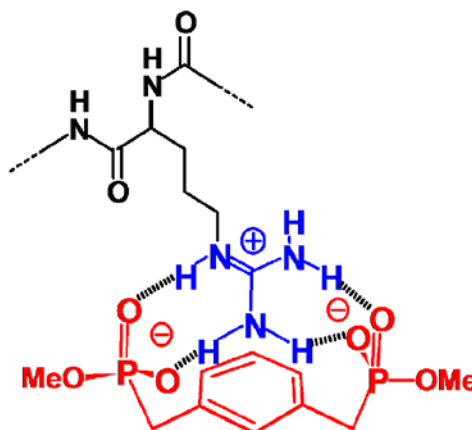
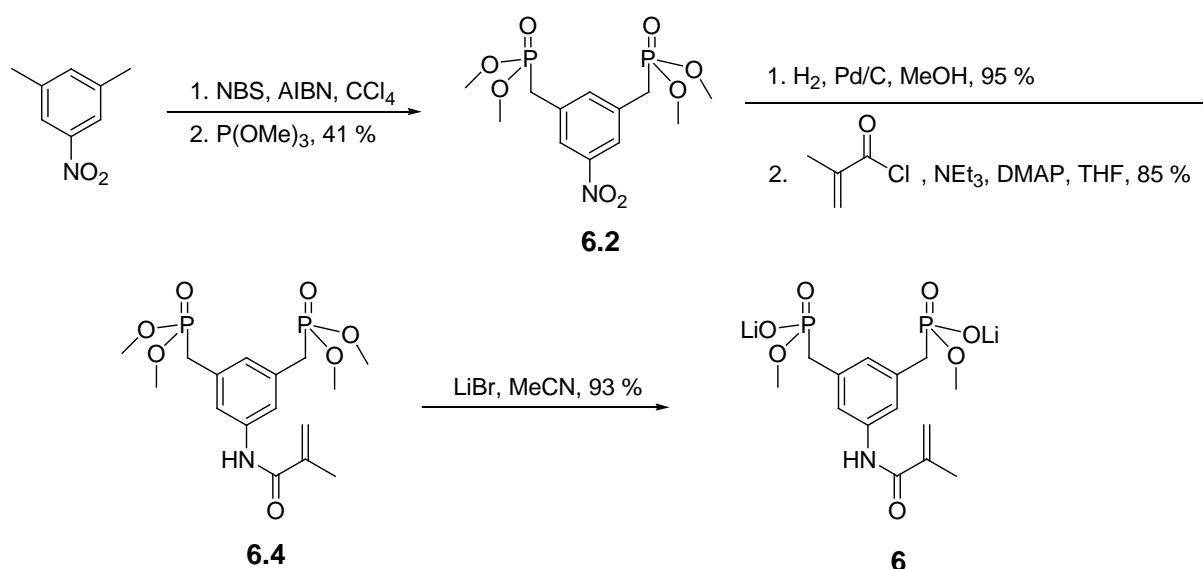


Abb. 3.6: Arginin-Bisphosphonat-Komplex.

Die Synthese des Bisphosphonat-Monomers **6** verläuft ausgehend von *m*-Nitroxylol in fünf Stufen^[34]:

Abb. 3.7: Syntheschema des Bisphosphonat-Monomers **6**.

Die Bromierung der Seitenketten von *m*-Nitroxytol erfolgt radikalisch mit *N*-Bromsuccinimid. Der Rückstand wird als Produktgemisch in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion mit Trimethylphosphit umgesetzt und säulenchromatographisch aufgereinigt.

Die Reduktion der Nitro-Gruppe wird unter Wasserstoffatmosphäre mit einem Pd-Katalysator durchgeführt. Die Gesamtausbeute dieser drei Stufen wird durch die Bromierung limitiert; die Ausbeute dieser Stufen liegt aufgrund der großen Zahl an Nebenprodukten (Ein- oder Mehrfachbromierungen) bei maximal 50 %.

Die Peptidkupplung erfolgt DMAP-katalysiert mit Methacrylsäurechlorid. Das entstehende HCl wird durch Zugabe stöchiometrischer Mengen Triethylamin neutralisiert. Um vorzeitige Polymerisation zu verhindern wird die Reaktion bei 0°C durchgeführt.

Die einfache Spaltung der Phosphonsäureester wird durch siebentägiges Rühren bei 60°C mit 2 eq LiBr erreicht. Renner^[34] zeigte, dass bei Temperaturen bis 80°C keine Polymerisation initiiert wird. Durch mehrmaliges Waschen mit Acetonitril und Diethylether wird das Produkt in reiner Form erhalten.

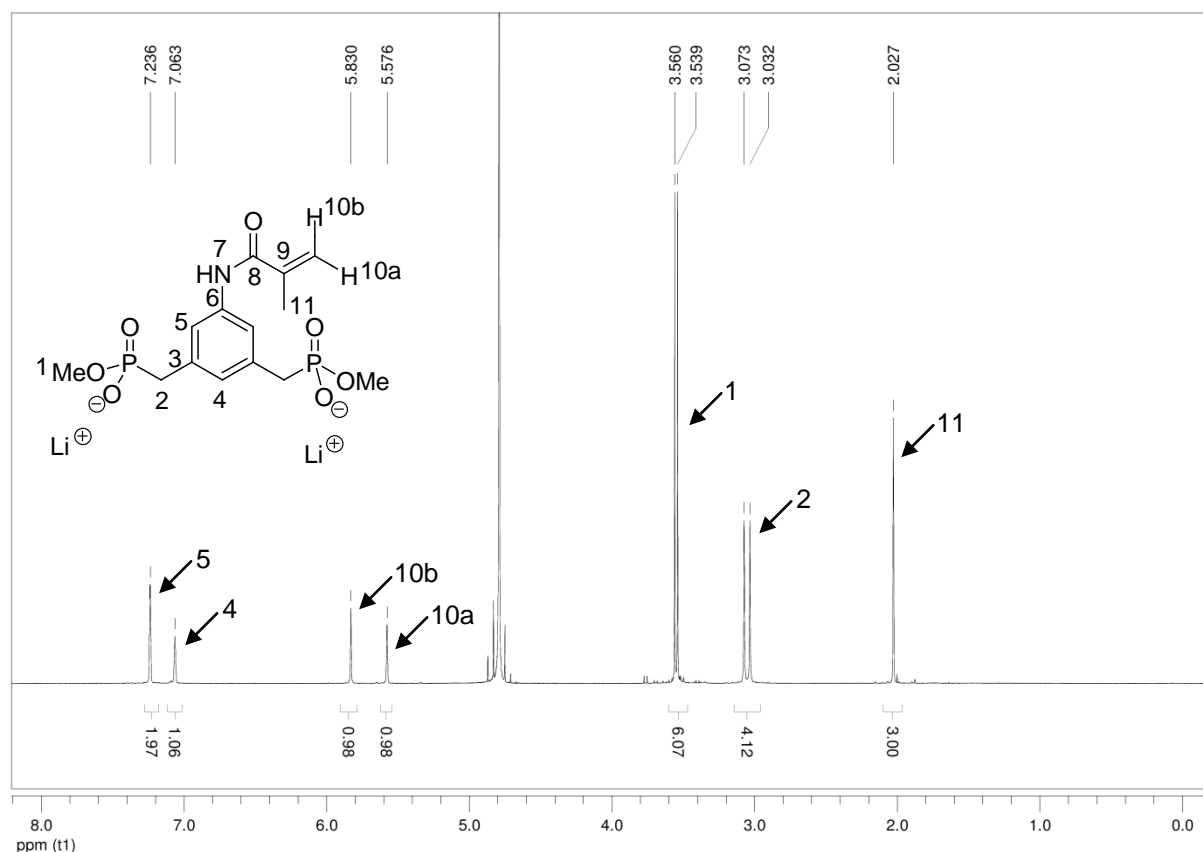


Abb. 3.8: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) des Bisphosphonat-Monomers **6** in D₂O.

Die Protonen der Methoxy- und der Methylen-Gruppen werden aufgrund der PH-Kopplungen als Dubletts aufgespalten. Das Integral der Methoxy-Gruppen zeigt, dass bei der Spaltung mit LiBr lediglich eine Esterspaltung pro Phosphonat-Gruppe stattfindet. Die aromatischen Protonen liegen tieffeldverschoben oberhalb von 7 ppm vor.

3.1.2. Erkennung saurer Aminosäuren

Waren die zuvor synthetisierten Polymere auf die Bindung basischer Proteine beschränkt, sollte ein neuer Rezeptor den Zugang zu Polymeren ermöglichen, die auch saure Proteine binden können.

Das von *Sun* ^[37] synthetisierte Ammonium-Monomer **10** kann in Wasser nur schwache Bindungen zu Carboxylaten ausbilden und ist nicht selektiv gegenüber negativ geladenen funktionellen Gruppen. Der von *Schmuck* ^[109-111] entwickelte Carboxylat-Rezeptor (vgl. Abb. 3.2) ist hochselektiv und zeigt auch in Wasser gute Bindungsstärken zu Carboxylaten ($K_{\text{ass}} = 5 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1}$ in 60 % DMSO, 40 % H₂O ^[106]).

Zur Komplexierung der sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat wurde im Rahmen dieser Arbeit das CBS-Monomer (Carboxylatbindungsstelle) **7** in Anlehnung an den von *Schmuck* entworfenen Rezeptor synthetisiert.

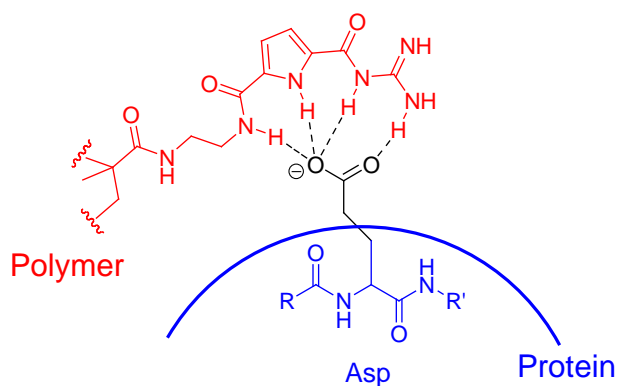


Abb. 3.9: Asp-CBS-Komplex.

Die Synthese verlief in acht Stufen unter teilweise bekannten Bedingungen. ^[110, 111]

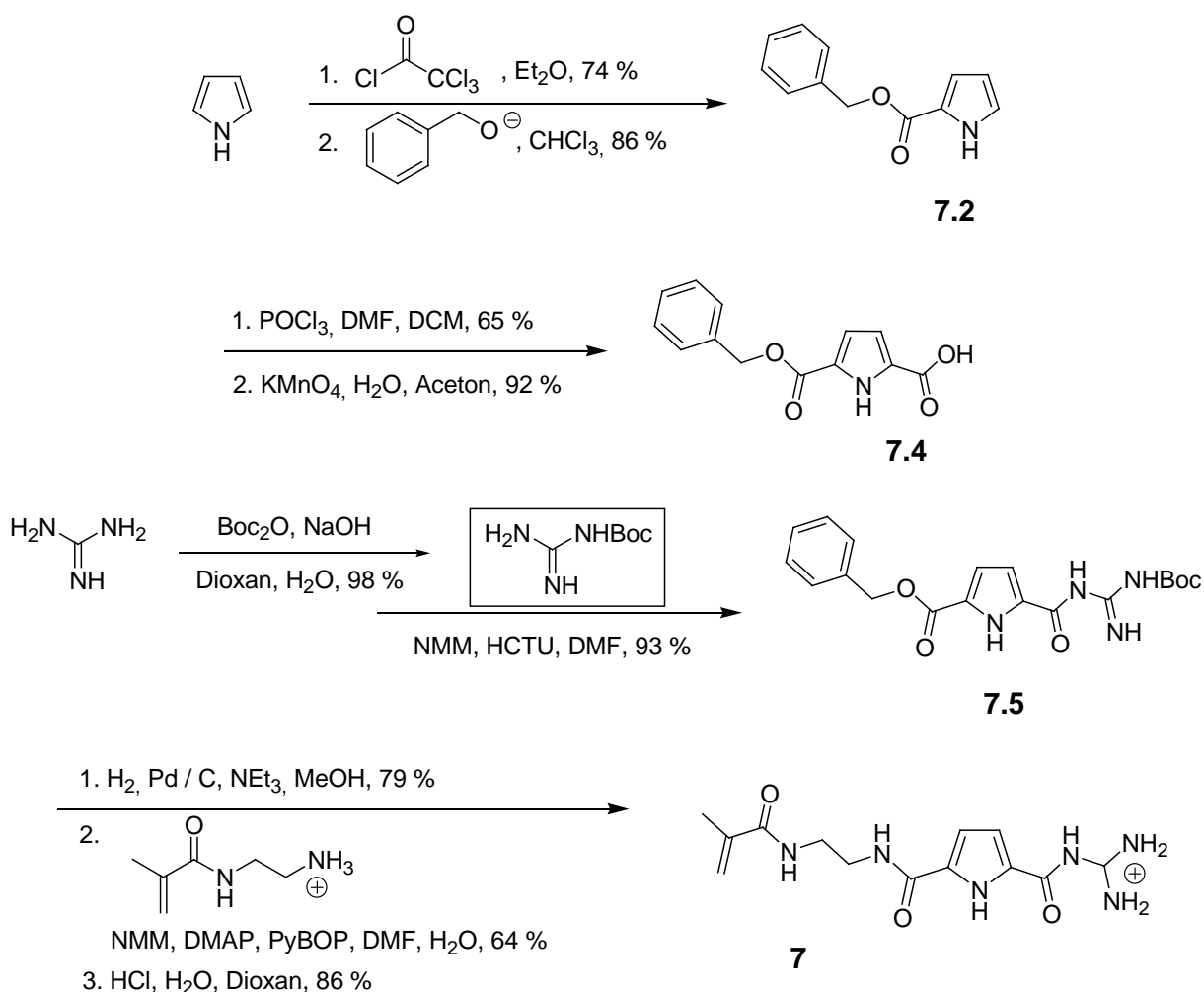


Abb. 3.10: Syntheschema des CBS-Monomers **7**.

Die ersten vier Stufen erfolgten wie in der Literatur beschrieben.

Bei der Kupplung von einfach Boc-geschütztem Guanidin mit 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester wurden 1.1 eq HCTU anstelle von PyBOP als Kupplungsreagenz verwendet, da auf diese Weise eine höhere Reinheit beim Ausfällen des Produktes erzielt werden konnte.

Bei der Abspaltung der Benzylgruppe wurde festgestellt, dass nach fünf Stunden noch kein vollständiger Umsatz erzielt wurde. Die Reaktion wurde daher zwei Tage bei 40°C unter H₂-Atmosphäre gerührt.

Die Kupplung von 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-Guanidinocarbonyl-2-carbonsäure mit dem Ammonium-Monomer **10** erfolgte mit PyBOP als Kupplungsreagenz, NMM als Base und DMAP als Hilfsbase.

Das CBS-Monomer **7** wurde durch Entschützung von 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)-ethyl]-amid mit HCl in Dioxan erzeugt. Die Reaktion verlief quantitativ ohne weitere Aufreinigung.

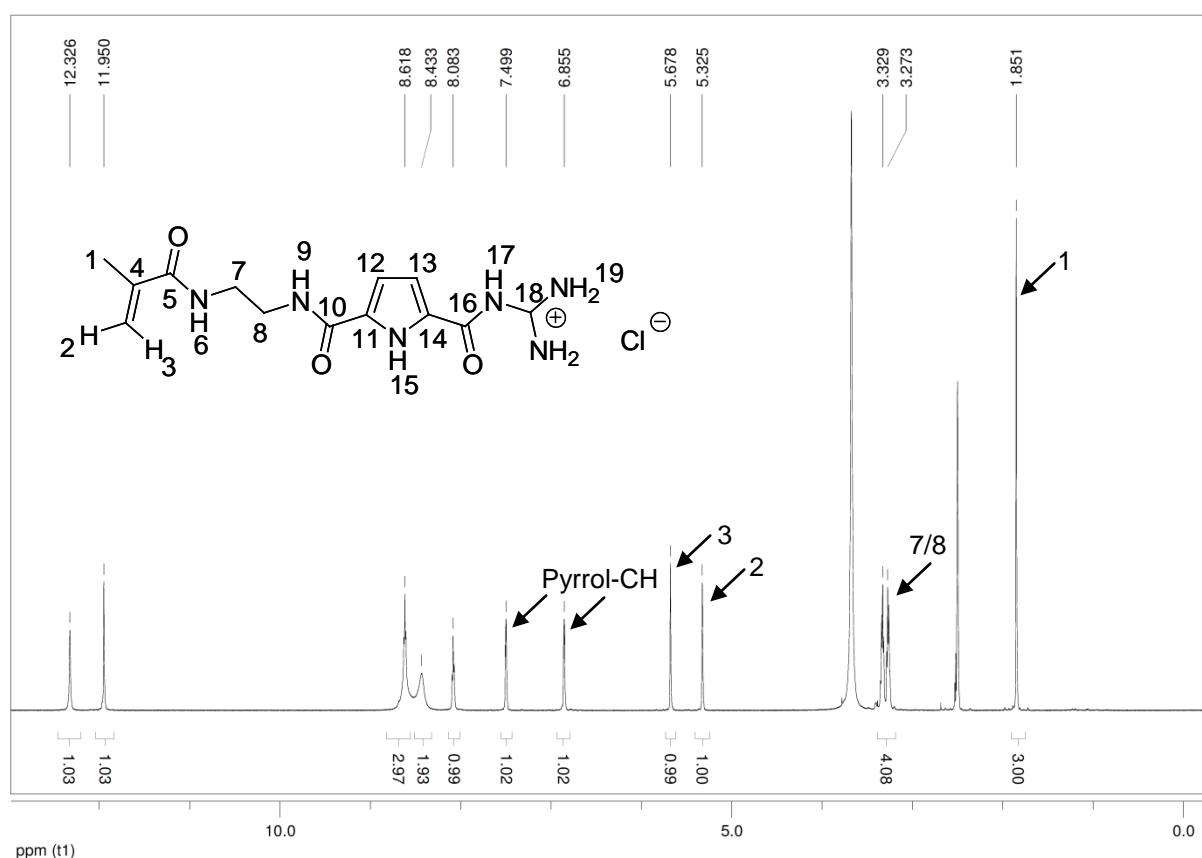


Abb. 3.11: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) vom CBS-Monomer **7** in DMSO-d₆.

Die Protonen der beiden Methylengruppen liegen bei 3.3 ppm als Multiplett aufgespalten vor. Oberhalb von 8 ppm liegen die Signale der stickstoffgebundenen Protonen. Eine genaue Zuordnung war ebensowenig möglich wie die Unterscheidung der beiden Pyrrol-Protonen, deren Verschiebungen bei 7.50 ppm und 6.86 ppm liegen.

3.1.3. Histidin-Erkennung

Die Erkennung von Histidinresten auf der Oberfläche von Enzymen war bislang in der Arbeitsgruppe *Schrader* nicht verfügbar.

In biologischen und biochemischen Reinigungs- und Analytikverfahren werden zur Komplexierung von Histidinresten Ni^{2+} -Ionen komplexierende Nitrilotriacetat-Derivate (NTA) verwendet.

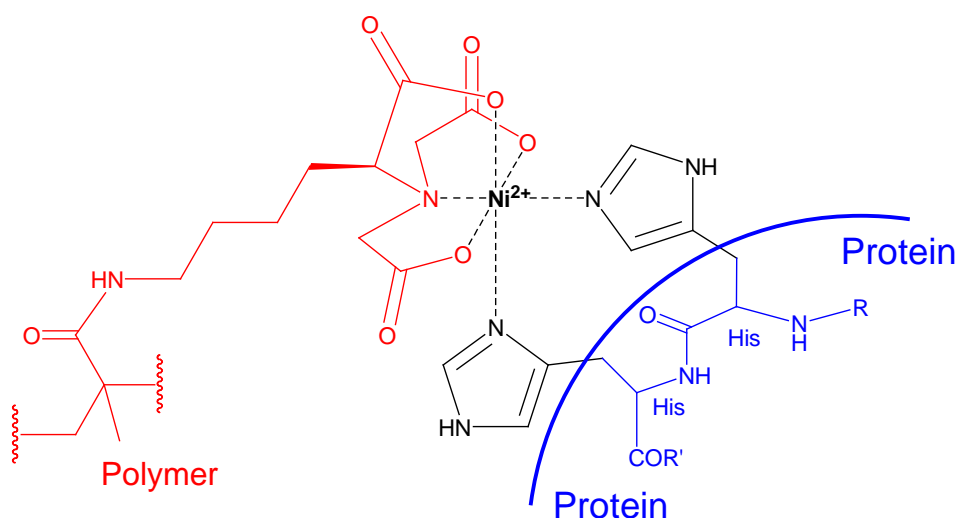


Abb. 3.12: Zwei His-Reste eines Proteins werden über ein Ni^{2+} -Ion von dem NTA-Monomer **8** komplexiert.

Das Ni^{2+} -Ion wird oktaedrisch von den drei Carboxylaten und dem tertiären Amin des NTA-Moleküls sowie von zwei Stickstoff-Atomen des Imidazol-Ringes zweier Histidin-Reste des Proteins komplexiert. Diese müssen sich auf der Oberfläche in räumlicher Nähe befinden, jedoch nicht notwendig in direkter Nachbarschaft in der Proteinsequenz vorliegen.

Dieses Bindungsmotiv wurde bereits erfolgreich von *Shea* mit einem polymerisierbaren Rest funktionalisiert.

Die Synthese verläuft in vier Stufen ausgehend von *N*^ε-Benzyloxycarbonyl-L-lysinmethylester (H-Lys(Z)-OMe). Dieses wird mit Bromessigsäuremethylester umgesetzt, es erfolgt eine zweifache Substitution am *N*-Terminus des Lysinderivats. Nach Z-Entschützung mit H₂, Pd/C erfolgt die Kupplung der Seitenkette mit Methacrylsäurechlorid. Die Methylester werden durch Zugabe von 3.3 eq NaOH verseift.

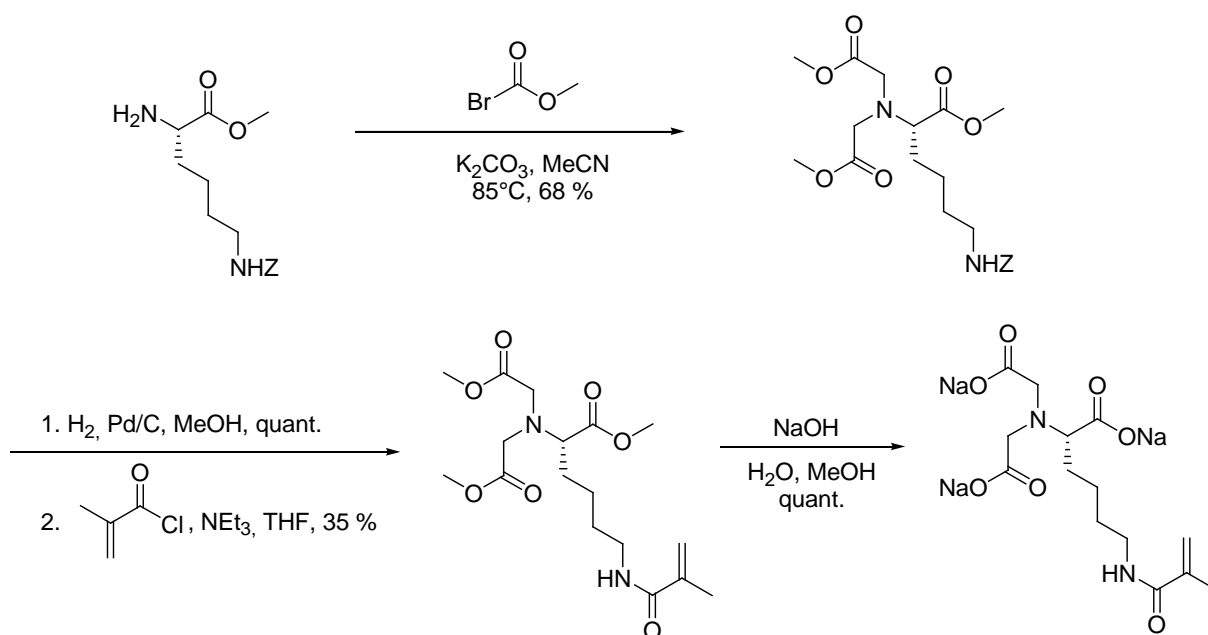


Abb. 3.13: Syntheseschema des NTA-Monomers.

Die Synthese basiert zwar auf der Synthese von *Shea* ^[107], der den Rezeptor als Trilithium-Salz erhielt, es wurden jedoch diverse Modifikationen vorgenommen:

In der ersten Stufe wurde Bromessigsäuremethylester anstelle des Ethylesters verwendet.

Entsprechend wurde die Entschützung in Methanol durchgeführt, um Umesterungen zu vermeiden.

Laut Literatur sollte die Kupplung mit 1 eq Methacrylsäurechlorid mit einer Ausbeute von 46 % verlaufen. Es konnten allerdings nur Ausbeuten von maximal 12 % erzielt werden. Daher wurde das seitenkettenentschützte Lysinderivat mit 3.9 eq Methacrylsäurechlorid umgesetzt; die Ausbeute konnte auf 35 % erhöht werden.

Problematisch war die säulenchromatographische Reinigung: Zum einen waren die R_f -Werte der drei voneinander zu trennenden Substanzen sehr ähnlich (0.38, 0.41, 0.43 in Cyclohexan / Essigsäureethylester 1:2), so dass Mischfraktionen nicht zu vermeiden waren. Zum anderen war das Produkt in DC-Analysen nur sehr schwach zu erkennen. Mit Ninhydrin-, CAM-Lösung und in der Iod-Kammer kann es nicht angefärbt werden, des Weiteren ist es nur schwach UV-aktiv.

Die Verseifung der Methylester führte bei Zugabe von 3 eq und Überschüssen von LiOH zur Di-, Tri- und Oligomerisierung des Rezeptors. Die Esterspaltungen mit Überschüssen an NaOH führten ebenso wie mit Trimethylsilyliodid in CCl_4 zu einer großen Zahl an Nebenprodukten. Durch Zugabe stöchiometrischer Mengen wässriger 2 M NaOH in Methanol wurde schließlich das NTA-Monomer in reiner Form erhalten.

2D-NMR-Experimente und MS-Analysen bestätigen das Produkt als den gewünschten Rezeptor.

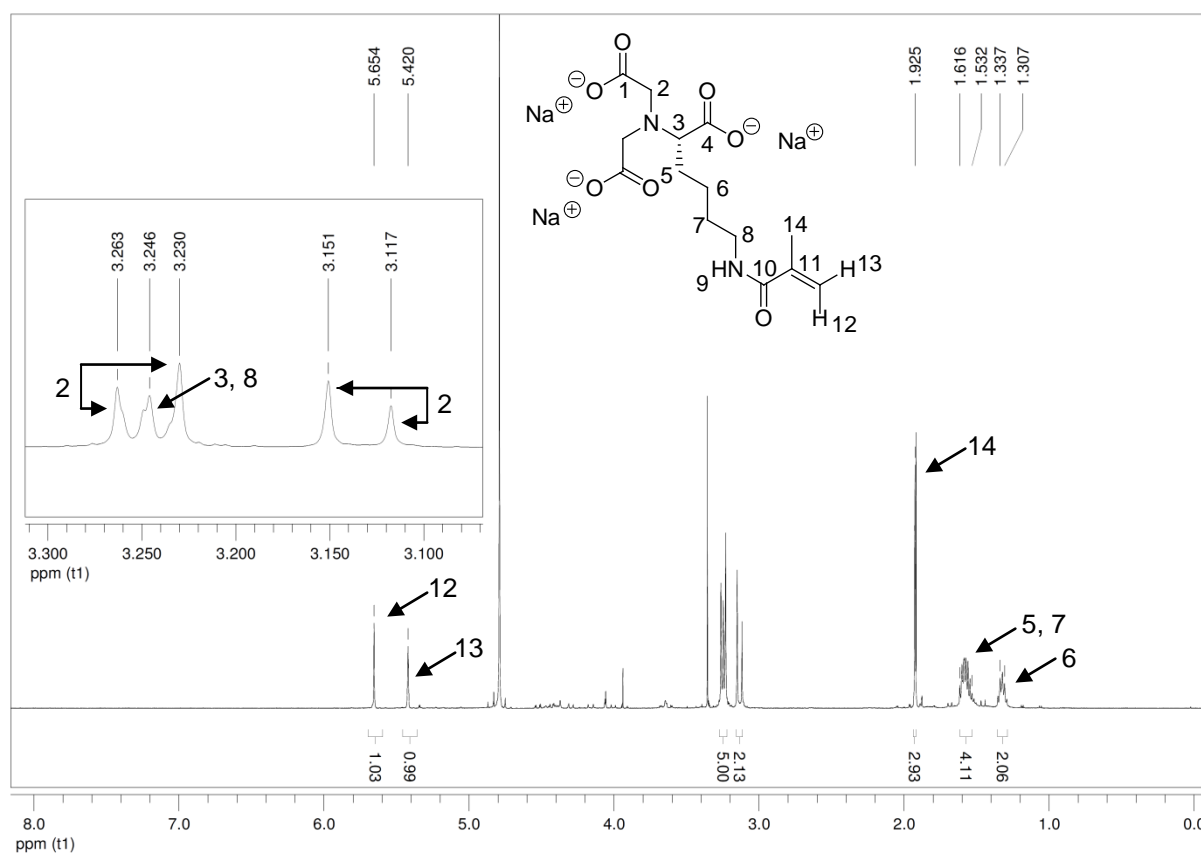


Abb. 3.14: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des NTA-Monomers in D_2O .

Die Protonen der Methacrylsäureeinheit liegen bei 1.93 ppm sowie bei 5.42 ppm und 5.65 ppm. Die Protonen **5-7** der Lysin-Seitenkette sind unterhalb von 2 ppm hochfeldverschoben. Die Protonen **2, 3** und **8** in Nachbarschaft zu den elektronenziehenden Substituenten liegen im Bereich von 3.1 bis 3.3 ppm. Eine Aufspaltung zu zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von 16.8 Hz ist für die diastereotopen Protonen der Methylengruppen **2** zu beobachten.

3.1.4. Erkennung aromatischer Aminosäuren

Die Bindung aromatischer Aminosäuren auf Proteinoberflächen konnte durch das Dansyl-Monomer **3** bislang nur schwach durch π -Stapel-Wechselwirkungen realisiert werden. Eine deutlich stärkere Komplexierung erfolgt mit β -Cyclodextrin-Derivaten.

β -Cyclodextrin ist ein aus sieben Glucosemolekülen 1,4-glycosidisch verknüpftes cyclisches Oligosaccharid. Die dadurch entstehende toroidale Struktur enthält einen Hohlraum mit einem Durchmesser von 6.2 Å und einer Höhe von 7.9 Å.

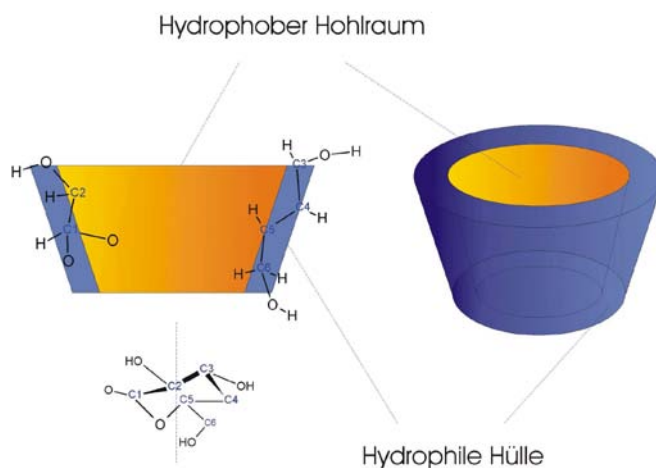


Abb. 3.15: Molekularer Aufbau von β -Cyclodextrin. ^[112]

Die hydrophobe Kavität im Inneren ermöglicht die Bildung von Einschlussverbindungen mit apolaren organischen Verbindungen. ^[112, 113] So zeigt z.B. das sperrige Benzolderivat *tert*-Butylphenol eine Bindungskonstante von 10^5 M^{-1} zu β -Cyclodextrin.

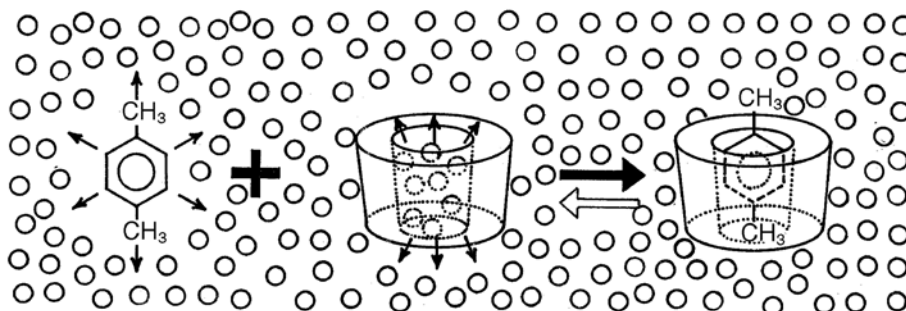


Abb. 3.16: Schematische Darstellung des Einschusses von *p*-Xylol durch β -Cyclodextrin in wässriger Lösung. ^[113]

Die Bindung aromatischer Aminosäuren kann daher mit Hilfe des β -Cyclodextrin-Monomers **9** (CD) realisiert werden.

Die Synthese des CD-Monomers **9** verläuft dreistufig ausgehend von β -Cyclodextrin.

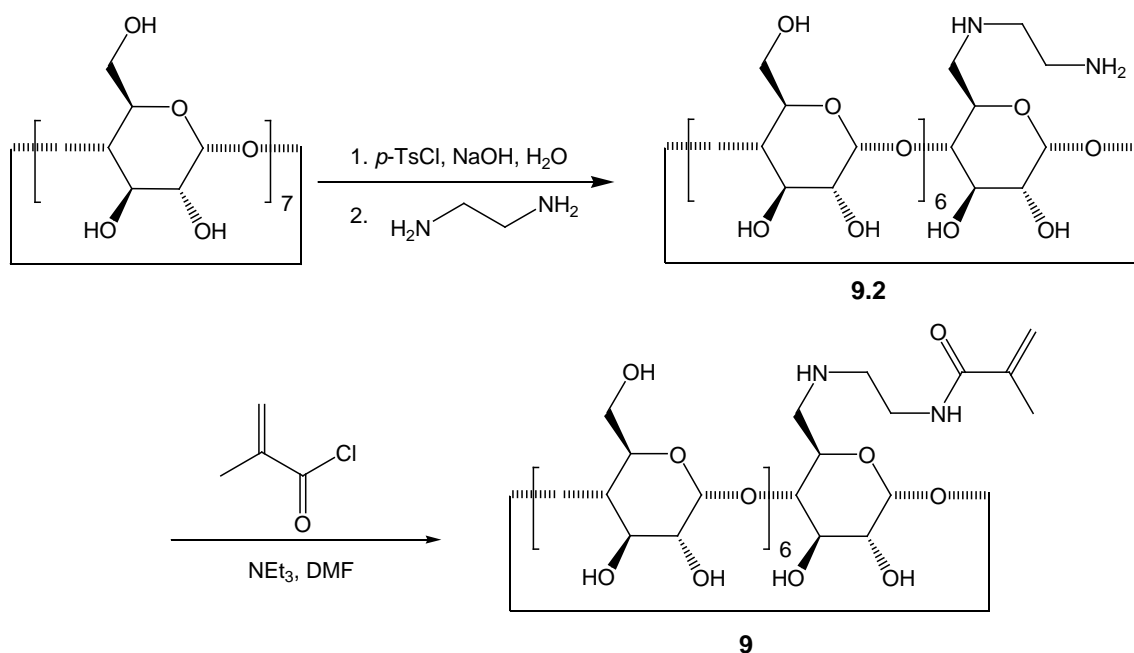


Abb. 3.17: Syntheschema des CD-Monomers.

Zunächst wird ein primärer Alkohol mit *p*-Toluolsulfonsäure in wässriger Natronlauge zum Tosylat umgesetzt. Es wird ohne weitere Aufreinigung das einfach tosylierte Produkt in 90 %iger Reinheit erhalten. Da eine Umkristallisation die Reinheit nur auf bis zu 93 % erhöht ^[114], wird das Rohprodukt weiter umgesetzt. Die Ausbeute beträgt bis zu 47 % bei Ansatzgrößen von 1 g – 5 g. Größere Ansätze verringern die

Ausbeute stark, bei Ansätzen mit mehr als 15 g CD kann keine Produktbildung nachgewiesen werden.

Das Tosylat wird durch Zugabe von Ethylendiamin substituiert. Durch Fällung des Produktes aus dem Reaktionsgemisch in Ethanol wird das Amin in reiner Form erhalten.

Das primäre Amin wird in einer Peptidkupplungsreaktion mit Methacrylsäurechlorid umgesetzt, zugegebenes Triethylamin neutralisiert die freiwerdenden Protonen. Häufig wurden bei dieser Reaktion unvollständige Umsetzungen beobachtet, durch eine anschließende erneute Reaktion erfolgte jedoch eine vollständige Kupplung. Das Produkt konnte durch Fällern aus Methanol in reiner Form erhalten werden.

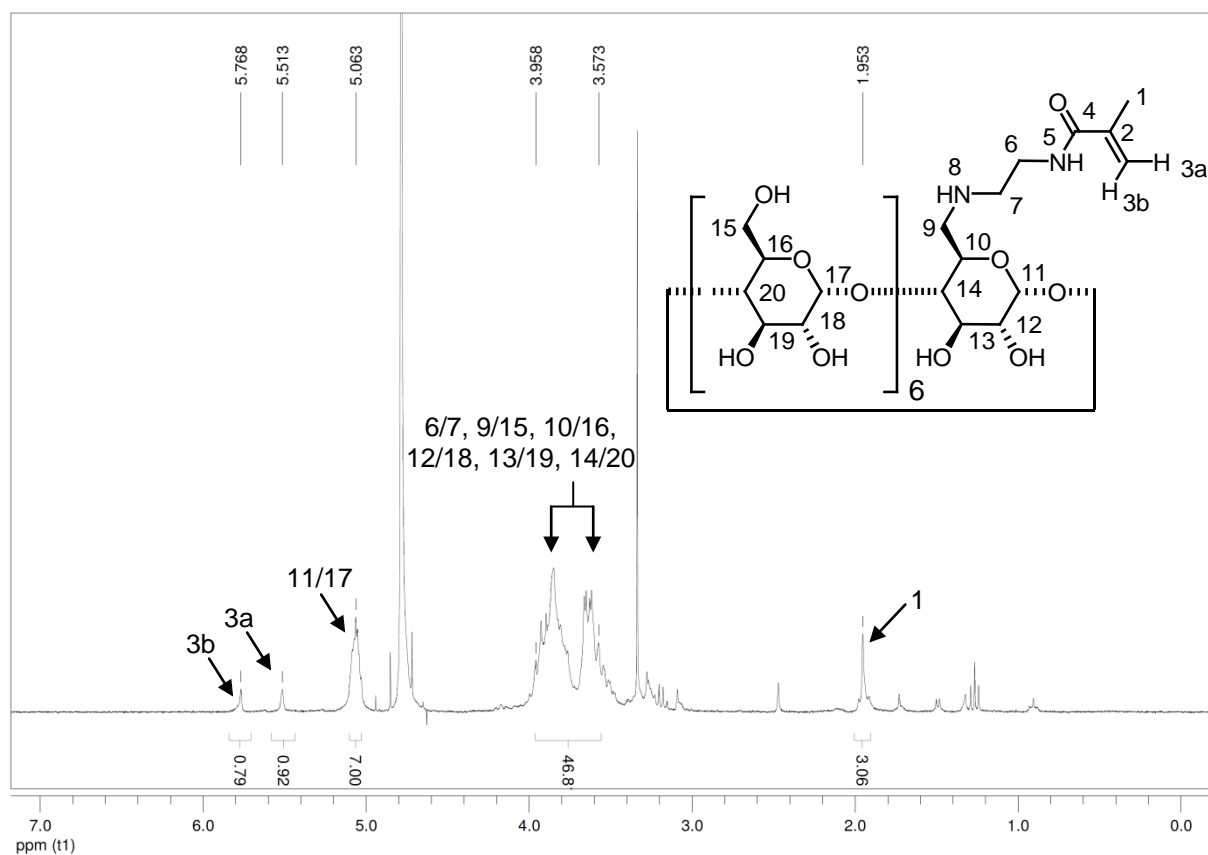


Abb. 3.18: ^1H -NMR-Spektrum des CD-Monomers **9** in D_2O .

Die Protonen der anomeren Zentren liegen bei 5.06 ppm getrennt von den anderen Zuckersignalen. Diese sind ebenso wie die Protonen der Methylengruppen weiter hochfeldverschoben zwischen 3.5 ppm und 4.0 ppm. Eine genauere Zuordnung war jedoch nicht möglich. Sowohl das Fällungsmittel Methanol als auch Reste von Triethylamin konnten im Hochvakuum nicht vollständig entfernt werden

3.1.5. Substratmimetische Monomere

Eine Verstärkung der Enzyminhibierung könnte durch zusätzliche Monomere, die die Substrate nachahmen, realisiert werden. Diese Substratmimetika können durch Besetzung der S₁-Bindungstasche der Proteasen den Substratzugang verhindern.

Dafür wurden Aminosäuren, die in den aktiven Zentren der Verdauungsenzyme gebunden werden, am N-Terminus mit Methacrylsäurechlorid gekuppelt und dadurch polymerisierbar gemacht. So wurde für Trypsin ein Lysin-Monomer hergestellt und für Cathepsin D ein Phenylalanin-Monomer. Desweiteren wurde ein Alanin-Monomer synthetisiert. Es war zu beachten, dass diese Monomere am C-Terminus keine spaltbaren Peptidbindungen besitzen, da das Substratmimetikum ansonsten zum Substrat würde.

Die Synthese ging in allen Fällen von C-terminal methylgeschützten Aminosäuren aus, im Fall des Lysins war die Seitenkette Boc-geschützt.

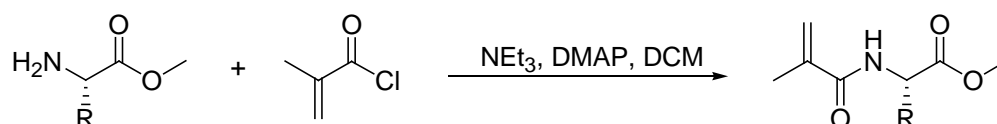
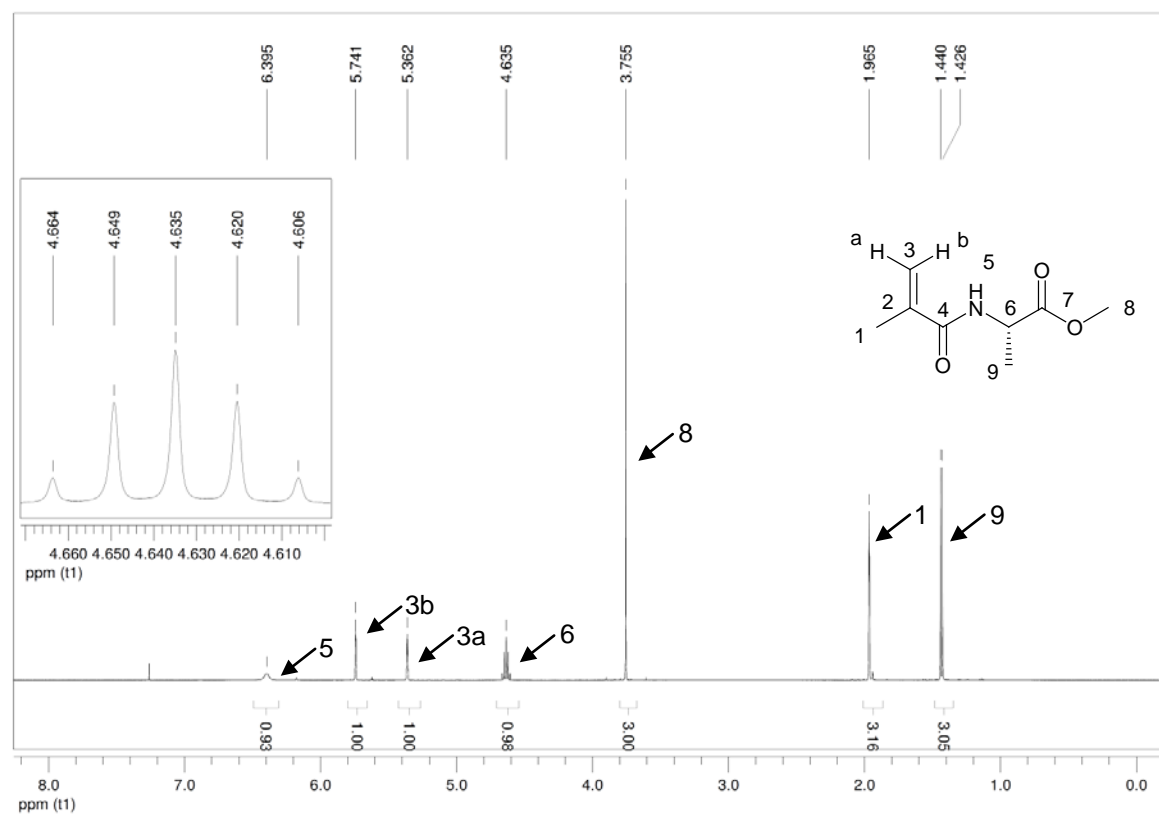
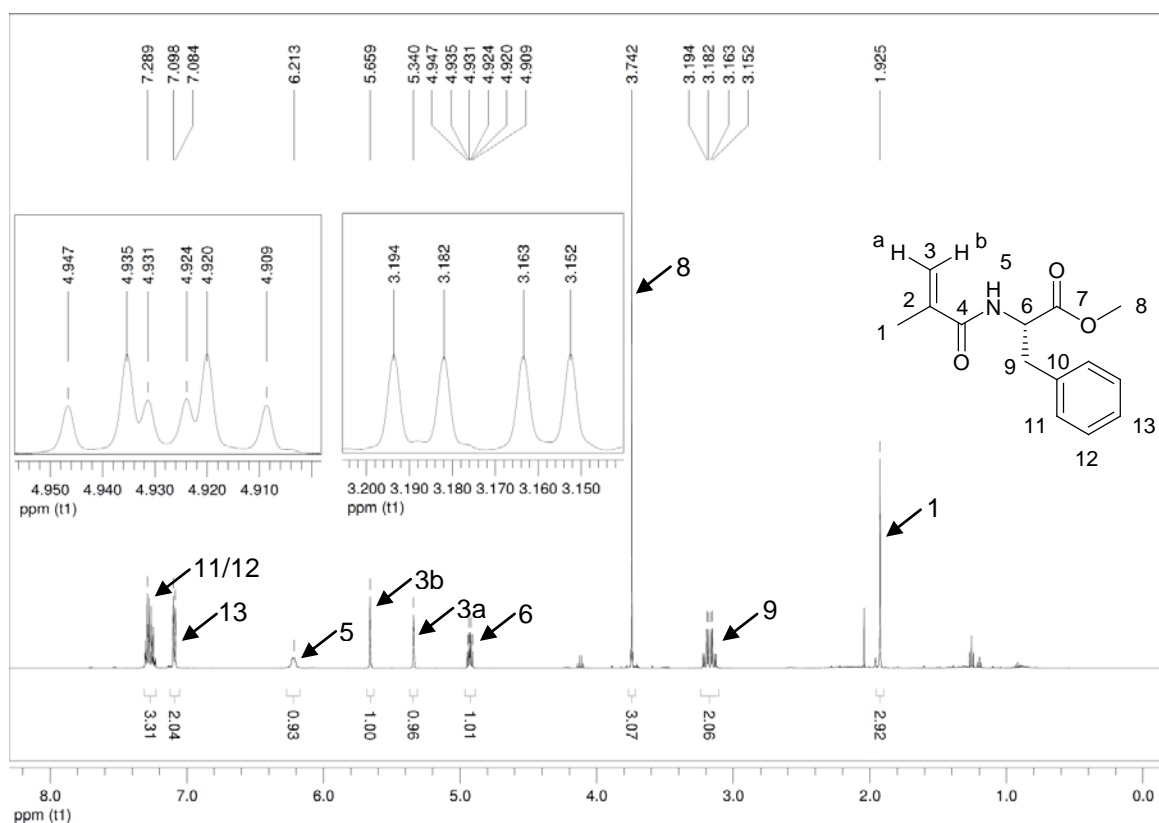


Abb. 3.19: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung polymerisierbarer Aminosäuren.

Die polymerisierbaren Aminosäuren Alanin und Phenylalanin wurden in einer Stufe durch Umsetzen mit Methacrylsäurechlorid analysenrein erhalten.

Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt die Protonen des Phenylrings oberhalb von 7 ppm. Aufgrund des Stereozentrums der Aminosäure sind die Protonen **6** und **9** aufgespalten: Das Proton **6** zeigt ein Dublett zum Amid und ein Triplet zur benachbarten Methylengruppe. Die Methylester-Protonen liegen als Singulett bei 3.74 ppm. Es sind noch geringe Mengen an Ethylacetat im Spektrum zu beobachten, die trotz Gefriertrocknen nicht vollständig entfernt werden konnten.



Die Protonen der Methylgruppe der Alanin-Seitenkette sind hochfeldverschoben bei 1.43 ppm und aufgrund der Kopplung zum Proton **6** zu einem Dublett aufgespalten. Das Proton **6** liegt als Quintett aufgespalten tieffeldverschoben bei 4.64 ppm.

Zur Darstellung des Lysin-Monomers wurde ein Lysin-Derivat eingesetzt, dessen Seitenkette Boc-geschützt und dessen C-Terminus methylgeschützt vorlag, und mit Methacrylsäurechlorid unter basischen Bedingungen gekuppelt. Die Boc-geschützte Seitenkette des Lysin-Monomers wurde mit Hilfe von Trifluoressigsäure entschützt.

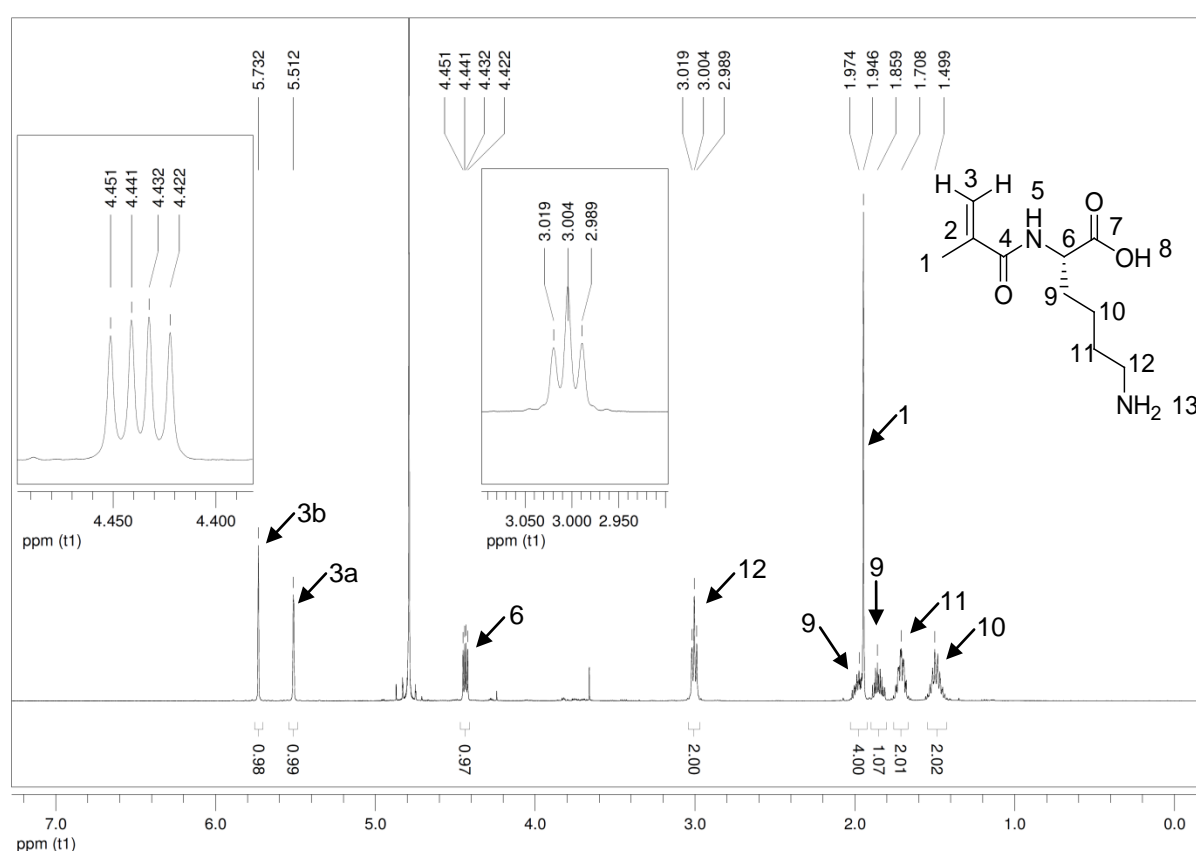


Abb. 3.22: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des Lys-Monomers **13** in D_2O .

Mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren konnte eine genaue Zuordnung der Protonen der Lysin-Seitenkette erfolgen. Die beiden Protonen der Methylen-Gruppe **9** liegen in direkter Nachbarschaft zum Stereozentrum und sind als diastereotopie Protonen bei 1.86 ppm und 1.97 ppm unterschiedlich stark verschoben. Die Methylen-Gruppe **12** spaltet zum Triplet aus, eine Kopplung zu den Amin-Protonen ist im Lösungsmittel D_2O nicht zu beobachten. Auch das Proton **6** zeigt eine Aufspaltung zu einem Doppeldublett durch die Kopplung zu den beiden Protonen der Methylen-Gruppe **9**.

Die Pankreaslipase spaltet Esterbindungen in Fetten. Daher ist als Substratmimetikum ein langkettiges polymerisierbares Molekül ohne Esterbindungen zu synthetisieren. Es wurde Stearinsäure peptidisch mit dem Ammonium-Monomer **10** gekuppelt.

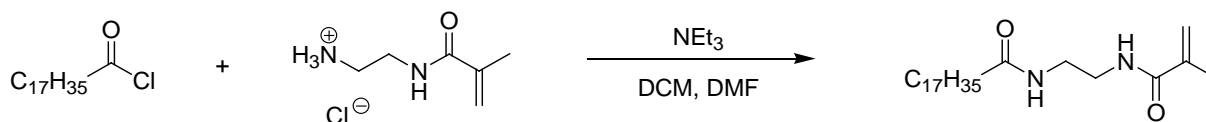


Abb. 3.23: Syntheschema zur Darstellung eines Stearinsäure-Monomers **11**.

Die Kupplung von Stearinsäurechlorid mit dem Ammonium-Monomer **10** führte zum analysenreinen Stearinsäure-Monomer **11**.

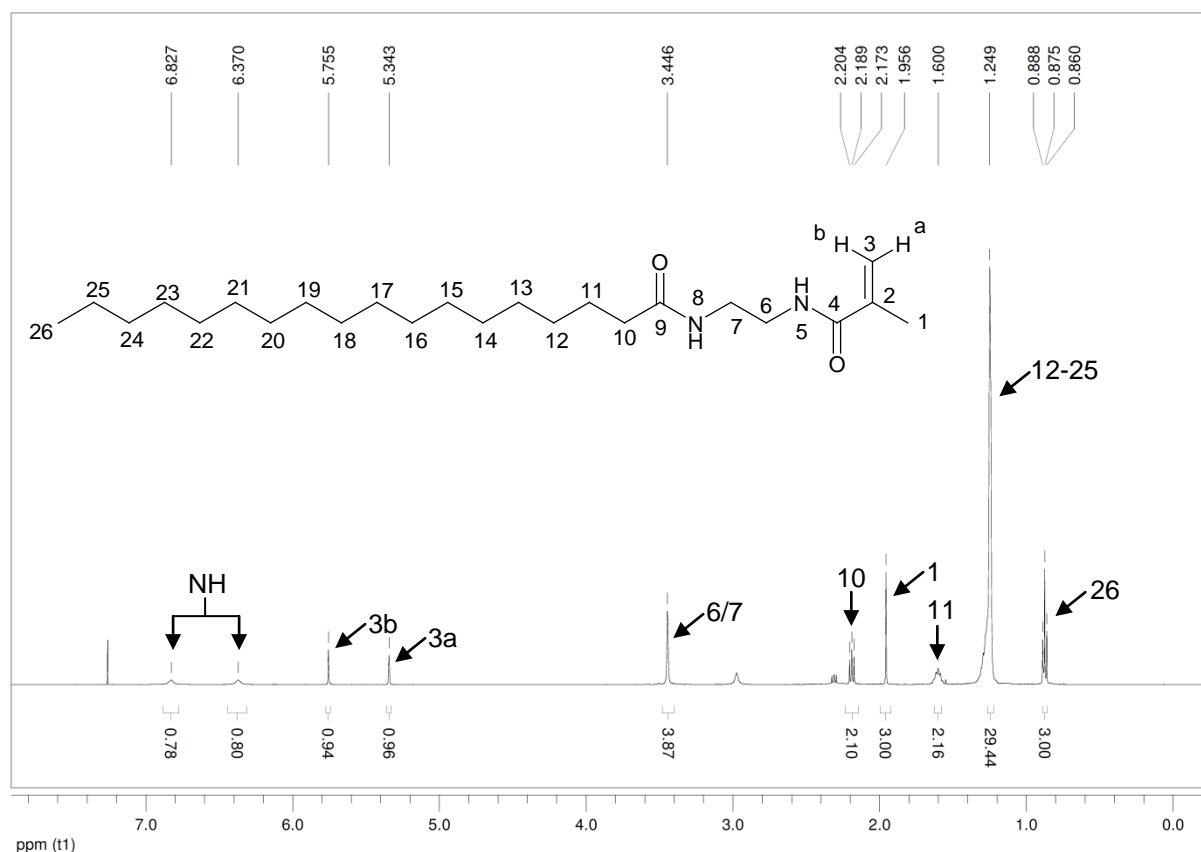


Abb. 3.24: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) des Stearinsäure-Monomers in CDCl_3 .

Hochfeldverschoben unterhalb von 2 ppm liegen die Protonen der unpolaren Methyl- und Methylen-Gruppen der Stearinsäure. Die den Amid-Gruppen benachbarten Methylen-Protonen liegen weiter hochfeldverschoben bei 2.2 ppm und 3.4 ppm.

3.1.6. Diskussion

Zur folgenden Planung der Polymerzusammensetzungen müssen einige Eigenschaften der Monomere genauer diskutiert werden:

Die Wasserlöslichkeit der Polymere hängt maßgeblich von der Wasserlöslichkeit der Monomere ab. Die Monomere können entweder in Wasser oder in DMF gelöst werden.

Tab. 3.1: Löslichkeit der Monomere.

Monomer	Löslichkeit in Wasser	Löslichkeit in DMF
1	- *	+
2	+	-
3	-	+
4	+	-
5	-	+
6	+	-
7	-	+
8	+	-
9	+	-
10	+	-
11	-	+
12	-	+
13	+	-
14	-	+

* + ≡ löslich; - ≡ unlöslich

Die hydrophoben Monomere **1**, **3**, **5**, **11**, **12** und **13** können wie erwartet nicht in Wasser gelöst werden. In DMF ist ihre Löslichkeit mit >100 mg/mL ausreichend hoch. Die aminosäurespezifischen Monomere **6**, **8** und **9** sind ebenso wie die Monomere **2**, **4**, **10** und **13** wegen der Möglichkeit, ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können, sehr gut wasserlöslich. Das CBS-Monomer **7** ist trotz der stark polaren, geladenen Guanidinium-Funktion in Wasser unlöslich. Auch seine Löslichkeit in DMF ist mit ca. 50 mg/mL deutlich geringer als die der hydrophoben Monomere.

Bei der Planung der Polymerisationen sollte die Kombination selbstassoziierender Monomere vermieden werden.

Das BP-Monomer **6** beispielsweise kann das Ammonium-Ion des Monomers **10** komplexieren. In Wasser sind diese Komplexe jedoch nicht sehr stark. Problematischer ist die Kombination mit dem CBS-Monomer **7**. Einerseits ist die Komplexierung mit dem Guanidinium-Ion des Rezeptors stärker als mit Ammonium-Ionen, andererseits wird durch das DMF-Wassergemisch beim Zusammengeben der Stammlösungen das Medium unpolarer und damit die Komplexierung stärker.

Die Kombination des CBS-Monomers **7** mit dem NTA-Monomer **8** kann durch Komplexierung der Carboxylatgruppen des NTA-Monomers ähnliche Probleme aufweisen. Die Bindungskonstante des CBS-Rezeptors zu Carboxylaten in Wasser liegt deutlich höher als die Bindung von Guanidinium-Ionen durch die BP-Pinzette. Da die Zugabe der Ni^{2+} -Ionen zur Komplexierung durch die Carboxylate des NTA-Monomers **8** erst nach der Polymerisation erfolgt, liegen die Carboxylate frei in Lösung vor.

Auch die Kombination des CD-Monomers **9** mit den aromatischen Monomeren **4**, **5** und **14** könnte zu Komplexierungen und damit zu Löslichkeitsproblemen bei den Polymeren führen.

3.2. Polymere

3.2.1. Entwurf der Polymere

Zur Herstellung proteinselektiver polymerer Inhibitoren müssen die Polymere bestimmte Kriterien erfüllen:

Zur Durchführung biochemischer Untersuchungen ist die Wasserlöslichkeit der Polymere zwingend erforderlich. Neben den wasserlöslichen spezifischen Monomeren **6**, **8** und **9** sind gerade zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen die wasserunlöslichen Monomere **1**, **3** und **5** zu verwenden. Auch das Carboxylat-Gruppen bindende CBS-Monomer **7** kann nicht in Wasser gelöst werden. Die Zugabe des Glucose-Monomers **2** oder des Ammonium-Monomers **10** kann die Wasserlöslichkeit der Polymere verbessern.

In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass sich bei etwa gleichem Molekulargewicht von Polymer und dem zu bindenden Enzym häufig 1:1-Komplexe ausbilden. Die Molekulargewichte dieser Polymere lagen bei etwa 30 kDa. Die Kettenlänge der Polymere kann theoretisch durch Variation der Initiatorkonzentration gesteuert werden. *Renner* zeigte jedoch, dass sich die Molekulargewichte der Polymere bei Konzentrationen zwischen 0.5 mol% und 3 mol% AIBN kaum unterscheiden. ^[33] Damit die Kettenlänge der Polymere nicht zu groß wird, wurden AIBN-Konzentrationen von 5 mol% verwendet.

Aufgrund des Methacrylsäurerestes, der radikalisch polymerisiert werden kann, ist die Grundstruktur aller Polymere die gleiche:

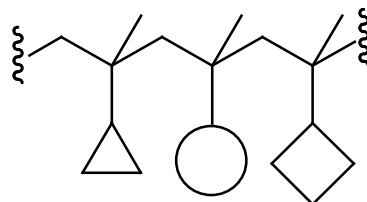


Abb. 3.25: Grundstruktur der Copolymere: Dreieck, Kreis und Quadrat symbolisieren verschiedene Monomerreste.

Die verschiedenen Monomerreste sind in Abb. 3.25 durch Dreieck, Kreis und Quadrat angedeutet.

Zur Bindung an ein Enzym muss das Polymer ausreichend flexibel sein, um sich an die Enzymoberfläche anpassen zu können. Zwei funktionelle Monomerreste sind im Polymer über eine Methylengruppe verknüpft. Dieser Abstand von zwei Bindungen zwischen sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen gewährt aufgrund der freien Drehbarkeit um die beiden Bindungen eine hohe Flexibilität. Die Faltung der Polymerkette ist abhängig von den enthaltenen Monomerseitenketten.

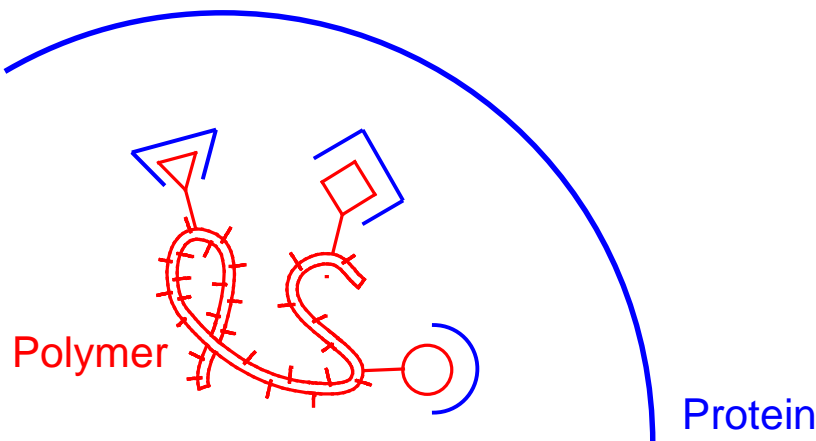


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Bindung eines Polymers auf einer Enzymoberfläche: In rot dargestellt sind das Polymer und einige bindende Reste, in blau die Proteinoberfläche mit Bindungsstellen für die Polymerreste.

Ob ein Enzym von einem Polymer gebunden oder inhibiert wird, hängt von der Komplementarität der Oberflächen ab. So können basische Enzyme mit einem hohen Argininanteil auf der Oberfläche in der Regel gut von BP-haltigen Polymeren gebunden werden, nicht aber von CBS-haltigen. Eine starke Bindung ist jedoch nicht gleichzusetzen mit einer Inhibierung. Erfolgt die Bindung eines Polymers beispielsweise auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite und führt keine Denaturierung herbei, ist eine Inhibierung nicht möglich. Es muss also bei der Planung der Polymerzusammensetzung die Oberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums beachtet werden.

Bei der Oberflächenanalyse der Verdauungsenzyme Chymotrypsin und Trypsin kann zunächst festgestellt werden, dass Chymotrypsin und Trypsin als basische Enzyme viele Lysine und einige Arginine auf ihrer Oberfläche tragen. Die Kombination des BP-Monomers **6** mit dem NTA-Monomer **8**, dem CD-Monomer **9** und den unpolaren Monomeren **1**, **3** und **5** sollte erwartungsgemäß zum Erfolg führen. Besonders

Polymere mit drei oder fünf Äquivalenten des BP-Monomers **6** sollten starke Effekte zeigen.

Cathepsin D und Lipase sind saure Proteine. Für diese Enzyme sollten also besonders CBS-haltige Polymere gute Inhibitoren darstellen.

Das Thrombin mit seinem annähernd neutralen isoelektrischen Punkt und einer gleichmäßigen Verteilung saurer und basischer Aminosäuren auf der Oberfläche könnte sowohl von CBS- als auch von BP-haltigen Polymeren inhibiert werden.

Das NTA-Monomer **8** könnte bei Serinproteasen das Histidin der katalytischen Triade im aktiven Zentrum binden und so die proteolytische Aktivität der Enzyme hemmen. Dieser Effekt kann nur auftreten, wenn das aktive Zentrum frei zugänglich ist. Beispielsweise bei Thrombin, dessen aktives Zentrum geschützt und nur für spezielle Substrate zugänglich ist, wird das Histidin nicht durch den NTA-Rest komplexiert werden können.

Weiterhin muss bei der Zusammensetzung der Polymere darauf geachtet werden, dass sich selbst erkennende Monomere in einem Polymer wie das BP-Monomer **6** und das CBS-Monomer **7** durch die Ausbildung stabiler Komplexe sowohl die Zahl freier Bindungsstellen als auch die Wasserlöslichkeit herabsetzen.

3.2.2. Synthese der Polymere

In Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Verfahren zur Polymerisation entwickelt, das es ermöglicht, mit geringem Aufwand und geringen Monomermengen eine große Zahl an Polymeren herzustellen.

In Arbeitskreis *Schrader* wurden die Polymerisationen zuvor radikalisch im Kolben mit mindestens 500 mg der Monomere durchgeführt. [33, 34, 115, 116] Die entstandenen Polymere wurden zur Reinigung in Ethylacetat gefällt. Dabei wurden häufig geringe Ausbeuten erzielt. Da zur Entwicklung eines Screeningverfahrens jedoch eine große Zahl an Polymeren benötigt wird, wäre bei der herkömmlichen Polymerisationsmethode ein immenser synthetischer Aufwand erforderlich.

Sun^[37] versuchte, radikalische Polymerisationen in kleinem Maßstab in Mikrotiterplatten durchzuführen. Die Polymerisationszeiten waren jedoch sehr lang und die Ausbeuten gering.

Erfolgreich verlief die Polymerisation in verschließbaren 1 mL Glasgefäßen: Die Monomere wurden in DMF, Wasser oder DMF/Wasser-Gemischen als Stammlösungen gelöst und in den gewünschten molaren Verhältnissen zusammengegeben. Es wurde radikalisch unter Zugabe von 5 mol% AIBN als Radikalstarter polymerisiert, so dass die Anordnung der Monomere statistisch erfolgte. Die Reaktionsgemische wurden eine Woche in einem Thermomixer bei 60°C unter ständigem Schütteln inkubiert (a) und anschließend lyophyllisiert (b). Die so erhaltenen pulvrigen Polymere (c) konnten in Wasser gelöst, in Mikrotiterplatten überführt (d) und in Enzymassays untersucht werden (e).

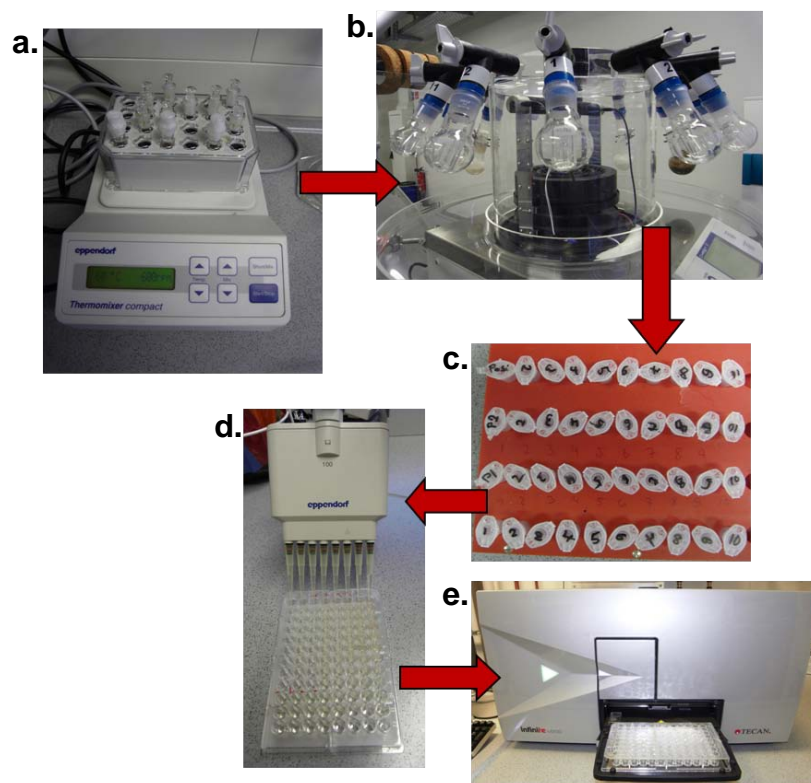


Abb. 3.27: Schematische Darstellung der Polymerisationstechnik und der weiteren Verwendung der Polymere.

Mit dieser Methode konnte die benötigte Monomermenge um mehr als 90 % verringert werden, es war keine Aufarbeitung nötig, die Ausbeuten waren quantitativ. Im Thermomixer konnten 24 Polymerisationen gleichzeitig durchgeführt werden.

Zur Durchführung der Enzymassays waren wasserlösliche Polymere zwingend erforderlich. Löslichkeitsprobleme traten jedoch mit dem CBS-Monomer **7** auf, das auch in monomerer Form wasserunlöslich ist. Durch Zugabe von zehn und mehr Äquivalenten des Glucose-Monomers **2** oder von wenigen Äquivalenten des Ammonium-Monomers **10** konnten CBS-haltige Polymere brauchbar in Wasser gelöst werden. Polymere, die sowohl CBS- als auch BP-Monomer enthielten, waren aufgrund der starken Bindung der Guanidinium-Funktionalität des CBS-Monomers durch die BP-Pinzette unlöslich und konnten nicht weiter untersucht werden.

3.2.3. Analyse der Polymere

Anhand der NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte das Einbauverhältnis der Monomere bestimmt und die Vollständigkeit der Polymerisation überprüft werden.

Da die Reaktionsgemische ohne weitere Aufreinigung getrocknet wurden, konnte in allen Fällen das gewünschte Einbauverhältnis anhand der Integrale bestätigt werden. Polymer **3** besteht aus BP-, Dodecyl- und Glucose-Monomer (5:1:1). Das Spektrum ist in Abb. 3.28 gezeigt. Die 15 aromatischen Protonen des BP liegen bei 7 ppm. Das Signal der 44 unpolaren Protonen der Dodecyl-Seitenkette und der Methylgruppen des Polymerrückgrats liegt hochfeldverschoben bei 1-1.5 ppm. Die 58 Protonen der Phosphonat-Gruppen, der Glucose und des Zuckers liegen bei 3.2-3.6 ppm. Die Signale der Methylengruppen des Polymerrückgrats liegen unter den DMF-Signalen und können daher nicht einzeln integriert werden.

Die noch vorhandene Menge an Monomeren wurde über das Integral der Doppelbindungsprotonen des Methacryl-Restes, deren chemische Verschiebungen zwischen 5 und 6 ppm liegen, bestimmt. Die Polymerisationen waren zu mehr als 90 % vollständig. Anhand des Spektrums von Polymer **3** wird deutlich, dass dieses Polymer vollständig polymerisiert vorliegt. Im Spektrum von Polymer **15** (Abb. 3.29) sind noch deutliche Reste der Doppelbindungsprotonen zu sehen. Ermitteln lässt sich die Menge an verbliebenem Monomer anhand des Integrals: Polymer **15** besteht aus BP-, NTA- und Glucose-Monomer (1:3:1). Kalibriert wurde auf das aromatische Signal des BP-Restes, die Doppelbindungsprotonen haben einen Wert von jeweils

0.33. Unter Berücksichtigung der Zusammensetzung des Polymers beträgt die Menge an noch vorhandenem Monomer ca. 7 %.

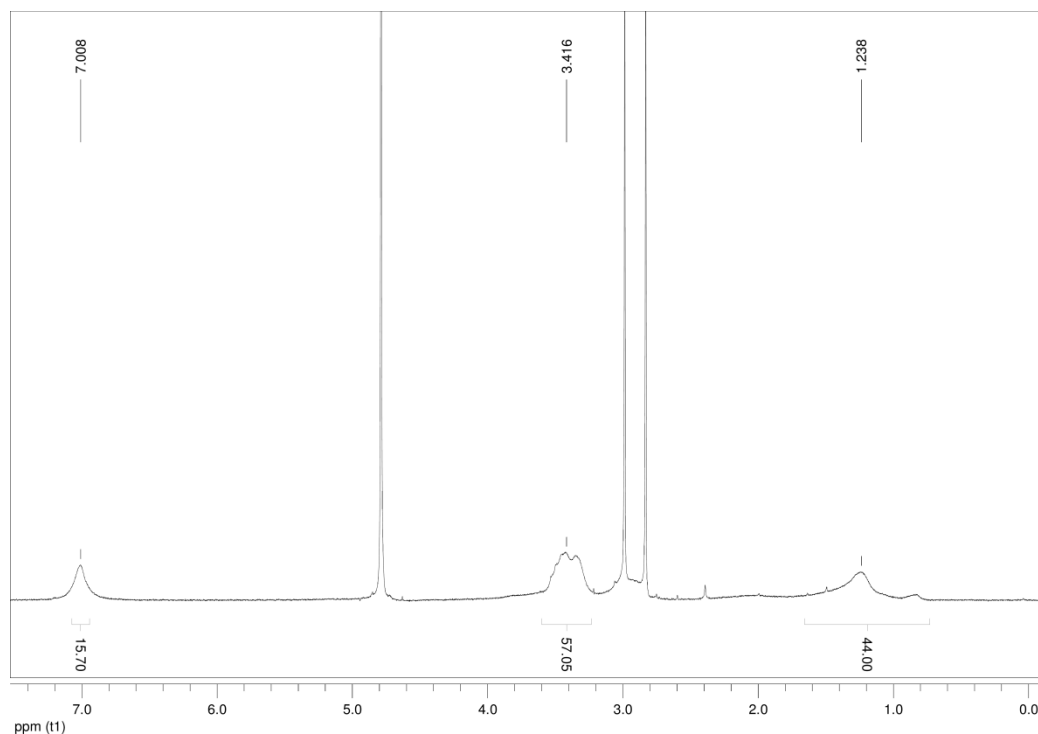


Abb. 3.28: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Polymer **3** in D_2O : Keine Monomersignale enthalten.

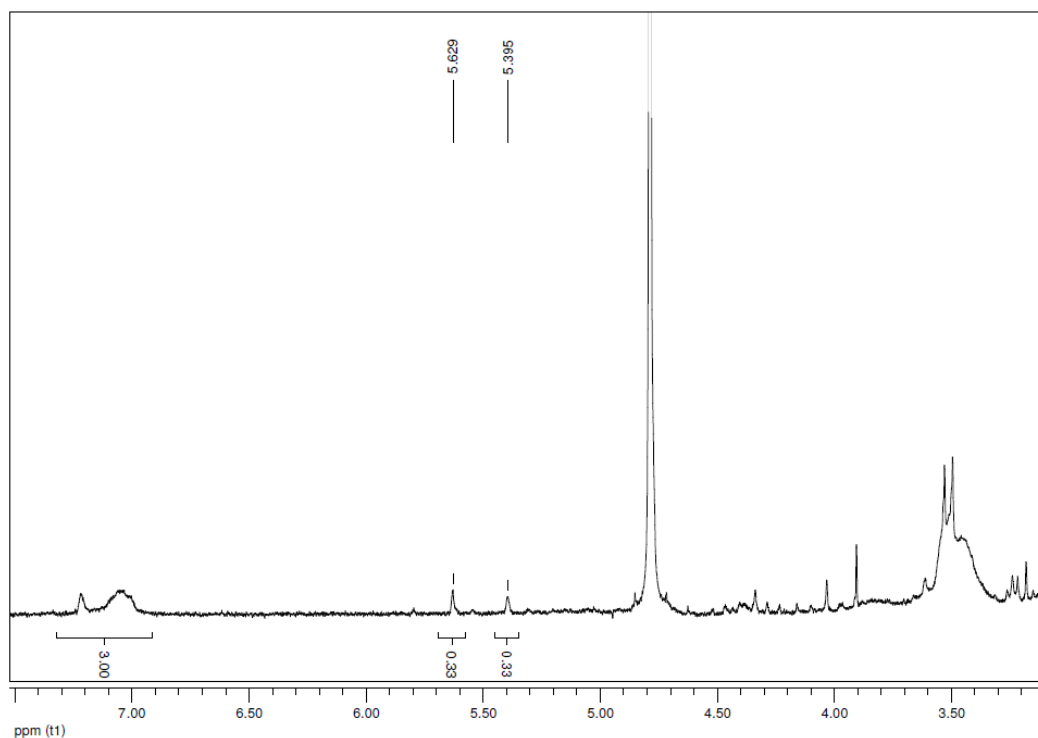


Abb. 3.29: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Polymer **15** in D_2O : Die Monomersignale liegen im Bereich zwischen 5 und 6 ppm.

Mittels GPC-Analyse konnte das Molekulargewicht der Polymere abgeschätzt werden.

Die gemäß Poly(ethylenglycol)-Standard ermittelten molaren Massen der Polymere lagen zwischen 50 und 200 kDa. Aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen dem Standard und den Polymeren kann das Ergebnis nicht als Absolutwert, sondern lediglich als Richtwert angesehen werden.

Weiterhin wurden GPC-Analysen mit Polyacrylat-Standard durchgeführt. Das Polymerrückgrat ist zwar in diesen Standards das gleiche wie bei den Polymeren, die Monomerreste sind jedoch viel größer, wodurch eine Angabe von definierten Molekulargewichten auch mit diesem Standard nicht möglich ist. Mit einem Polyacrylat-Standard können molare Massen zwischen 10^3 und 10^7 bestimmt werden.

Der Vergleich beider ermittelten Werte zeigt teilweise große Abweichungen, teilweise gute Übereinstimmungen. In Tabelle 3.2 sind beispielhaft einige Werte aufgeführt.

Tab. 3.2: Ermittelte Molekulargewichte der einiger Polymere mit unterschiedlichen Standards.

Polymer	Monomer- zusammensetzung	M _w / kDa	
		Poly(ethylenglycol)-Standard	Polyacrylat-Standard
1	6 / 2 / 3 (5:1:2)	150	2530
2	6 / 8 / 2 (5:3:1)	165	27
7	6 / 8 / 2 / 3 (3:1:1:0.5)	114	15763
31	7 / 2 (1:10)	67	90
35	9 / 2 / 3 (1:1:0.2)	97	139

Der Vergleich der Polymere **2** und **7** zeigt mit Poly(ethylenglycol)-Standard (PEG) ähnliche Werte, mit Polyacrylat-Standard (PAC) variieren sie um 10^3 kDa. Da bei beiden Polymeren die gleichen Monomere eingesetzt wurden, dürften keine Größenunterschiede aufgrund unterschiedlich guter Polymerisationseigenschaften der Monomere auftreten. Auch die Polymerisationsbedingungen waren in beiden Fällen gleich: Es wurde 6 Tage bei 60°C unter Zugabe von 5 mol% AIBN polymerisiert. Aus diesen Gründen können die mit Poly(ethylenglycol)-Standard bestimmten Massen als verlässlicher angesehen werden und wurden im Weiteren zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendet.

Tab. 3.3: Übersicht aller Polymere: Zusammensetzung, Polymeranteil, Molekulargewichte mit verschiedenen Standards, Polydispersität mit PEG-Standard und Wasserlöslichkeit.

Polymer	Monomere	Verhältnis	% Monomer	M _w / kDa (PEG)	M _w / M _n (PEG)	M _w / kDa (PA)	Wasserlös- lichkeit *
1	6 / 2 / 3	5:1:2		150	0.7	2530	+
2	6 / 8 / 2	5:3:1		165	0.65	27	+
3	6 / 5 / 2	5:1:1		112	0.65	10662	+
4	6 / 7 / 2 / 3	3:1:2:0.5					-
5	6 / 9 / 2 / 3	3:1:1:0.5		150	0.71	654	+
6	6 / 9 / 8 / 2 / 3	3:1:1:1:0.5		121	0.7	175	+
7	6 / 8 / 2 / 3	3:1:1:0.5		114	0.76	15763	+
8	6 / 9 / 2 / 3	1:1:3:0.5		179	0.59	2568	+
9	6 / 8 / 2 / 3	1:1:1:0.5		115	0.71	345	+
10	6 / 9 / 2 / 3	1:3:1:0.5					-
11	6 / 9 / 2 / 3	1:1:1:0.5		147	0.56	1224	+
12	6 / 5 / 2 / 3	1:1:1:0.5		114	0.69	862	+
13	6 / 8 / 2 / 3	1:3:1:0.5		121	0.64	848	+
15	6 / 8 / 2	1:3:1	7	63	0.81	15	+
16	7 / 5 / 2 / 3	3:1:1:0.5					-
17	7 / 8 / 2 / 3	3:1:1:0.5					-
18	7 / 9 / 2 / 3	3:1:1:0.5					-
19	7 / 8 / 2 / 3	1:1:1:0.5					-
20	7 / 5 / 2 / 3	1:1:1:0.5					-
21	7 / 2 / 3	1:1:3					-
22	7 / 8 / 2 / 3	1:3:1:0.5					-
23	7 / 9 / 2	1:3:1					-
24	7 / 9 / 2 / 3	1:1:3:0.5					-
25	7 / 9 / 2	1:3:1					-
26	7 / 9 / 2	1:1:3					-
27	7 / 5 / 2	1:1:1					-
28	7 / 2 / 3	1:5:3					-
29	7 / 5 / 2	1:1:5					-
30	7 / 5 / 2 / 3	1:1:5:0.5					-
31	7 / 2	1:10		67	0.34	90	+
32	7 / 2	1:20		87	0.34	276	+
33	6 / 9 / 2	1:1:1		198	0.54	25302	+
34	9 / 2 / 3	1:1:0.5	20	7	0.94		±
35	8 / 2 / 3	3:1:0.5		97	0.67	139	+
36	7 / 10 / 2	1:1:2					-
37	7 / 10 / 2	1:5:1		2	0.99		±

Polymer	Monomere	Verhältnis	% Polymer	M _w / kDa (PEG)	M _w / M _n (PEG)	M _w / kDa (PA)	Wasser-löslichkeit
38	7 / 8 / 10 / 2	1:1:1:1					-
39	7 / 9 / 10 / 2	1:1:1:1		7	0.97		±
40	8 / 1 / 2	1:1:1		95	0.76	98	+
41	7 / 1 / 10 / 2	1:1:2:1		3	0.92		±
42	8 / 1 / 2	1:1:1		105	0.7	322	+
43	9 / 8 / 2	1:1:1					-
44	8 / 5 / 2	1:1:1					-
45	8 / 4 / 2	1:1:1		62	0.65	22	+
46	9 / 4 / 2	1:1:1	50	7	0.96		±
47	7 / 4 / 1	1:1:1					-
48	7 / 2 / 11	1:10:1		7	0.95	7	±
49	7 / 2 / 11	1:20:1		50	0.6	12	+
50	6 / 9 / 2 / 11	1:1:1:1		144	0.75	709	+
51	6 / 9 / 2 / 11	1:1:3:1		87	0.56	348	+
52	6 / 8 / 2 / 14	5:3:1:3		94	0.62	111	+
53	6 / 5 / 2 / 14	5:1:1:3		79	0.59	62	+
54	6 / 8 / 2 / 3 / 14	3:1:1:0.5:3		139	0.46	456	+
55	6 / 2 / 3 / 14	5:1:2:1		92	0.67	43	+
56	6 / 8 / 2 / 14	5:3:1:1		133	0.74	236	+
57	6 / 5 / 2 / 14	5:1:1:1		109	0.61	95	+
58	6 / 8 / 2 / 3 / 14	3:1:1:0.5:1		111	0.69	80	+
59	6 / 5 / 2 / 13	5:1:1:1		194	0.78	58	+
60	6 / 9 / 2 / 3 / 13	3:1:1:0.5:1		155	0.54	1742	+
61	6 / 5 / 2 / 3 / 13	1:1:1:0.5:1		158	0.57	878	+
62	6 / 9 / 2 / 13	1:1:1:1		123	0.58	289	+
63	6 / 2 / 3 / 14	5:1:2:3		100	0.68	88	+
64	6 / 9 / 2 / 13	1:1:1:3		99	0.63	2538	+

* + ≡ gut löslich; ± ≡ schlecht löslich; - ≡ unlöslich

In den GPC-Spektren waren neben den Signalen der Polymere meist zwei weitere Signale bei Elutionsvolumina von ca. 18 mL und ca. 22 mL zu beobachten.

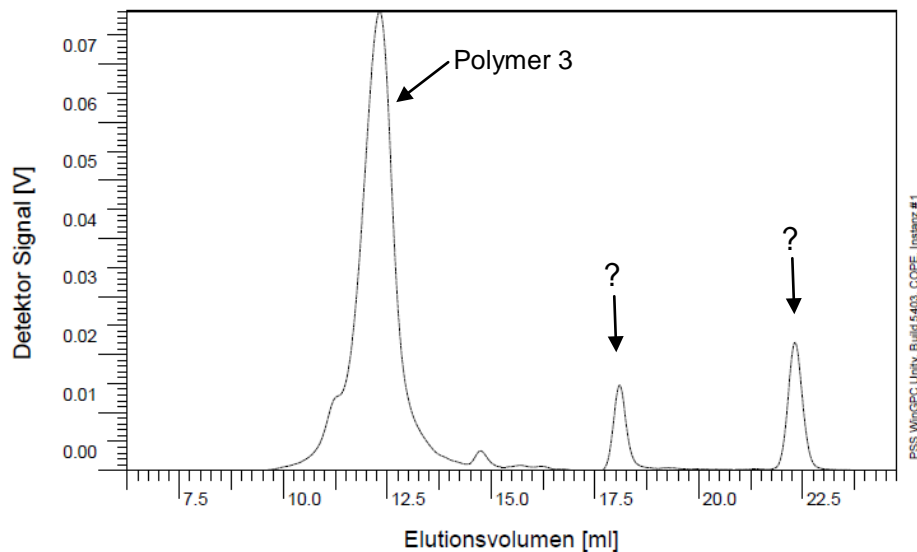


Abb. 3.30: GPC-Spektrum von Polymer **3**.

In Monomer-Analysen zeigte das Glucose-Monomer neben dem Hauptsignal bei einem Elutionsvolumen von 20 mL ein kleineres Signal bei 18 mL, das von einer Verunreinigung des Glucose-Monomers herrührt. Trotz mehrfacher Reinigung des Monomers **2** konnte diese Verunreinigung nicht vollständig entfernt werden.

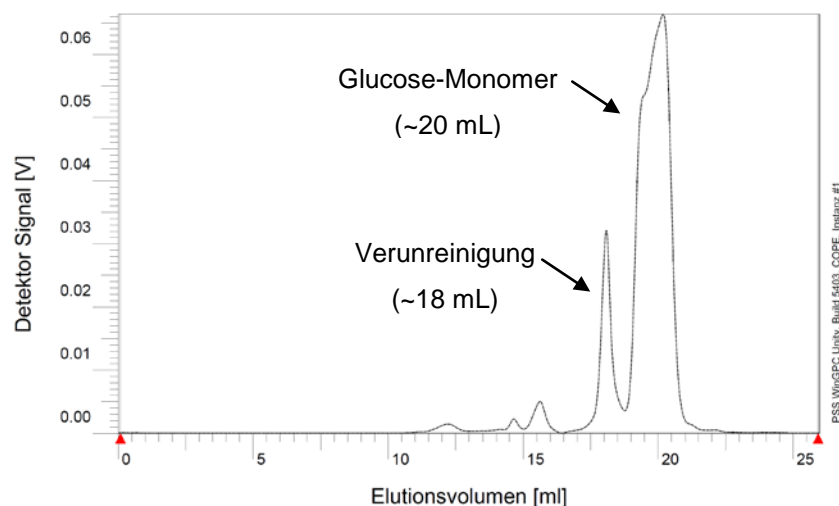


Abb. 3.31: GPC-Spektrum vom Glucose-Monomer **2**.

Das zweite Signal stammte von DMF-Resten, die auch in den NMR-Spektren sichtbar waren. Trotz mehrmaligen Aufnehmens der Polymere in Wasser und anschließendem Trocknen war es nicht möglich, das DMF vollständig zu entfernen.

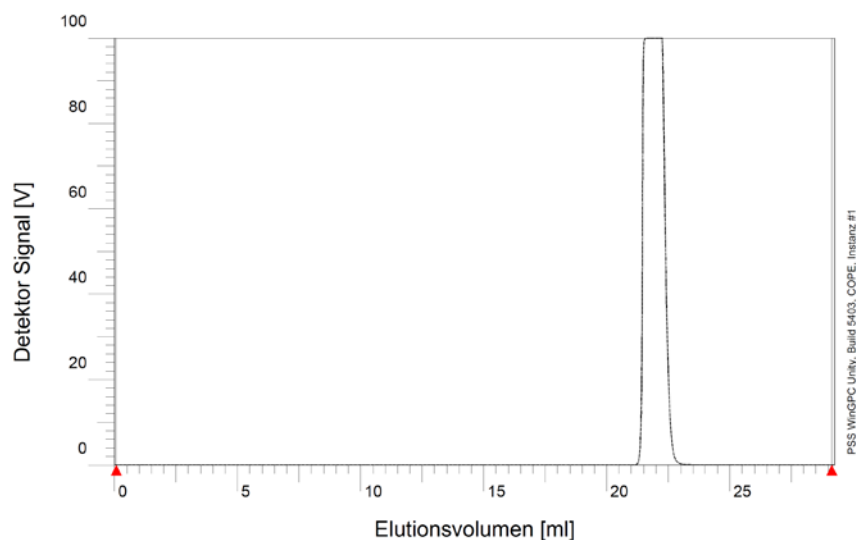


Abb. 3.32: GPC-Spektrum von DMF.

Das Screening mit den Enzymen zeigte, dass die enthaltenen Mengen an Monomeren sowie die DMF-Reste keinen Einfluss auf die Enzymaktivität haben.

3.2.4. Diskussion

Es wurden erfolgreich 64 Polymere mit verschiedenen Monomerzusammensetzungen hergestellt. Die meisten Polymere bestanden im Hauptteil aus einem oder mehreren der aminosäurespezifischen Monomere **6** – **9**. Eine Ausnahme bilden die CBS-haltigen Polymere: Aufgrund der schlechten Löslichkeit wurden Polymere mit bis zu 20fachem Überschuss an Glucose-Monomer **2** hergestellt.

Die 64 Polymere wurden in einem neu entwickelten Verfahren hergestellt. In verschließbaren 1-mL-Glasgefäßen konnten bis zu 24 Polymerisationen parallel im Thermomixer durchgeführt werden. Ohne Aufreinigung wurden die Polymere lyophilisiert und analysiert. Es konnten quantitative Ausbeuten bei meist vollständiger Polymerisation erzielt werden. Die benötigten Monomermengen konnten um mehr als 90 % im Vergleich der früher benötigten Mengen reduziert werden.

Die Untersuchung der Polymere mittels NMR-Spektroskopie und GPC-Analysen ließ Schlüsse auf Vollständigkeit der Polymerisation, Einbauverhältnis der Monomere, Molekulargewicht und Polydispersität zu:

Es wurden meist vollständige Polymerisationen erzielt. Das Einbauverhältnis wurde als das gewünschte bestätigt, da die Reaktionsgemische ohne Aufreinigung getrocknet wurden. Die Molekulargewichte liegen beim Vergleich mit PEG-Standard zwischen 50 und 200 kDa, mit PAC-Standard differieren sie stark zwischen 10^3 und 10^7 kDa. Die Bestimmung mit PEG-Standard kann als die verlässlichere angesehen werden. Die Polydispersität liegt bei den meisten Polymeren zwischen 0.6 und 0.8.

3.3. Enzyminhibierung

Die Herausforderung bestand nun darin, die Interaktion der Polymere mit Enzymen zu quantifizieren.

In den vergangenen Jahren wurde in der Arbeitsgruppe *Schrader* der Einfluss von Polymeren auf Enzyme lediglich durch die Bestimmung der Bindungskonstanten untersucht [33, 37, 103]. Ob die Polymerbindung eine Änderung der katalytischen Aktivität der Enzyme herbeiführt, kann auf diese Weise jedoch nicht festgestellt werden.

Für potentielle medizinische Anwendungen ist es interessant, inwiefern eine Enzymhemmung erfolgt und wie stark diese ist. IC_{50} -Werte sind zur Charakterisierung der Polymer-Enzym-Interaktion daher deutlich aussagekräftiger. Messungen im Mikrotiterplattenformat ermöglichen auch den Zugang zu Hochdurchsatzverfahren.

Die zu untersuchenden Enzyme sollten medizinisch relevant und für Medikamente leicht zugänglich sein. Die Verdauungsenzyme Chymotrypsin, Trypsin, Cathepsin D, Pankreaslipase und Thrombin erfüllen diese Kriterien:

Sie liegen extrazellulär auf der Darmschleimhaut. Die Polymere müssen keine Zellmembran überwinden und können oral appliziert werden, sofern sie unter den stark sauren Bedingungen im Magen stabil sind.

Als Serin- bzw. Aspartatproteasen ähneln sie sich in Struktur und Aufbau des aktiven Zentrums. Eine gezielte Hemmung einzelner Enzyme ist daher schwierig. Eine Vielzahl an Medikamenten, die bei einer Überproduktion oder Überaktivierung an Verdauungsenzymen zum Einsatz kommen, ist nicht selektiv für eine bestimmte Protease. Die Spezifität ist jedoch unbedingt erforderlich, da das Inhibieren der „falschen“ Proteasen zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. So ist beispielsweise die Inhibierung von Thrombin zu verhindern, da ansonsten der Blutgerinnungsprozess verhindert wird und innere Blutungen auftreten können.

Die Oberflächenstruktur unterscheidet sich von Enzym zu Enzym. Durch Anpassung der Polymere an die Oberfläche eines Proteins können spezifische Inhibitoren

gefunden werden, die im Folgenden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *de Groot* in Tierversuchen getestet werden können.

3.3.1. Allgemeine Vorgehensweise

Der Einfluss der hergestellten Copolymere auf die Enzyme wurde in einem einfachen Screening-Verfahren untersucht.

Die Aktivität der Enzyme wurde vor und nach Zugabe eines Überschusses an Polymer bestimmt und verglichen. Wurde keine Abnahme der Aktivität in Anwesenheit der Polymere beobachtet, wurden Polymer und Enzym zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Polymere, die einen Effekt auf die Enzymaktivität zeigten, wurden in Verdünnungsreihen weiter untersucht, um die IC_{50} -Werte zu bestimmen. Die IC_{50} -Werte zeigen die Konzentration an Inhibitor, bei der die Enzymaktivität auf 50 % abgesenkt wird. Die Polymerkonzentrationen liegen dabei je nach Enzymkonzentration zwischen 20 mg/mL und 2 µg/mL.

Polymerzusammensetzungen, die Effekte auf die Enzymaktivitäten zeigten, wurden unter Zugabe von einem oder drei Äquivalenten eines substratmimetischen Monomers polymerisiert und ebenfalls untersucht.

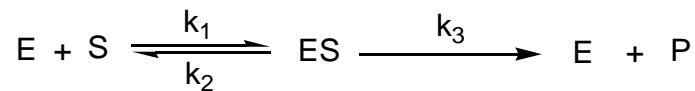
Das Enzym Thrombin dient als Referenzsystem, das nicht inhibiert werden darf. Es wurden nur Screening-Experimente mit Polymeren durchgeführt, die eines oder mehrere andere Enzyme in ihrer Aktivität einschränken.

3.3.2. Messmethoden

3.3.2.1. Enzymkinetik

Enzyme katalysieren in der Natur chemische Reaktionen und Prozesse. Zur Bestimmung der Aktivität liegt meist die *Michaelis-Menten*-Theorie zugrunde.^[117, 118]

Ausgangspunkt ist dabei die Gleichung:



E: Enzym, S: Substrat, ES: Enzym-Substrat-Komplex, P: Produkt, $k_{1,3}$: Geschwindigkeitskonstanten

Angenommen wird, dass das Enzym E mit dem Substrat S einen Komplex reversibel bildet und anschließend zum Enzym und dem Produkt zerfällt. Bei ausreichend großem Überschuss an Substrat ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes.

Die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten von ES führen zu folgenden Ergebnissen:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3 \cdot [ES] \quad (1)$$

Bildung von ES:
$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] \quad (2)$$

Zerfall von ES:
$$-\left(\frac{d[ES]}{dt}\right) = (k_2 + k_3) \cdot [ES] \quad (3)$$

Das *steady-state*-Prinzip besagt, dass sich bei Zugabe von Enzym zu seinem Substrat der Enzym-Substrat-Komplex zunächst mit einer bestimmten Geschwindigkeit bildet und seine Konzentration während der gesamten Reaktion beibehält.

$$0 = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_2 \cdot [ES] - k_3 \cdot [ES] \quad (4)$$

Die Summe aus freiem und substratkomplexiertem Enzym ist immer gleich der Anfangsenzymkonzentration.

$$[E] + [ES] = [E]_0 \quad (5)$$

Durch Einsetzen von (4) in (5) ergibt sich:

$$\Rightarrow [ES] = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{\left(\frac{k_2 + k_3}{k_1}\right) + [S]} = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

K_M : Michealis-Menten-Konstante (Maß für die Stabilität des ES-Komplexes)

Für die Reaktionsgeschwindigkeit zum Produkt gilt:

$$\Rightarrow v = \frac{dP}{dt} = k_3 \cdot [ES] = k_3 \cdot [E]_0 \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (7)$$

Ist das Enzym vollständig mit Substrat gesättigt, arbeitet es mit der maximalen Geschwindigkeit v_{\max} . Dies wird bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht, $[S]$ ist also viel größer als K_M . Dadurch vereinfacht sich (7) zu:

$$v_{\max} = k_3 \cdot [E]_0 \quad (8)$$

Das Einsetzen dieser Näherung in (7) führt zur *Michaelis-Menten*-Gleichung.

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (9)$$

Aus der Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration können graphisch v_{\max} und K_M ermittelt werden. ^[119]

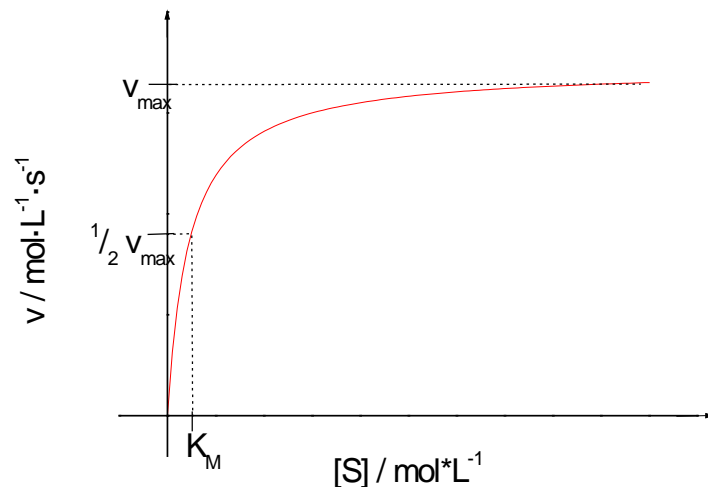


Abb. 3.33: Substratsättigungskurve. ^[119]

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von K_M und v_{\max} ist die doppelt reziproke Auftragung, hergeleitet aus der *Michaelis-Menten*-Gleichung von *Lineweaver* und *Burke*:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max} \cdot [S]} \quad (10)$$

Es ergibt sich eine Gerade, aus deren Abzissenabschnitt K_M und aus deren Ordinatenabschnitt v_{\max} abzulesen ist.

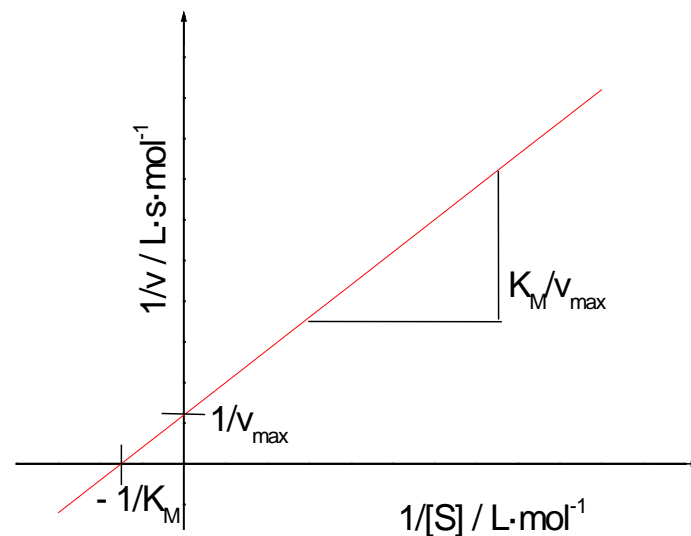


Abb.3.34: Lineweaver-Burke-Auftragung. ^[119]

Durch Zugabe bestimmter Stoffe kann die Aktivität von Enzymen herabgesetzt werden. Nachstehende Wirkungsweisen dieser Inhibitoren werden unterschieden. ^[119]

1. *Kompetitive Inhibitoren* konkurrieren mit dem Substrat um die Bindungsstelle des Enzyms. Je größer die Inhibitorkonzentration ist, desto weniger Substratmoleküle können gebunden werden. Die v_{\max} -Werte sind jedoch gleich, da bei sehr hohen Substrat-Konzentrationen kaum Inhibitormoleküle zum aktiven Zentrum gelangen können.

In der Lineweaver-Burke-Auftragung ist der Schnittpunkt mit der y-Achse daher unverändert, die Steigung mit Inhibitor ist jedoch größer als die des uninhibierten Enzyms.

2. Bei Zugabe eines *nichtkompetitiven Hemmers* kann zwar das Substrat weiterhin an das Enzym binden, es wird jedoch nicht umgesetzt.

Durch einen nichtkompetitiven Inhibitor wird v_{\max} herabgesetzt. Auch bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Maximalgeschwindigkeit des ungehemmten Systems nicht erreicht werden.

Die Lineweaver-Burke-Auftragung zeigt daher gleiche K_M -Werte, allerdings eine höhere Steigung im Vergleich zum gehemmten System.

3. Bei der *irreversiblen Inhibierung* bindet der Hemmer kovalent am aktiven Zentrum des Enzyms, eine Abspaltung ist nicht mehr möglich. Der Enzym-Substrat-Komplex ist katalytisch inaktiv.

Um den Einfluss von Inhibitoren auf Enzyme bestimmen zu können, werden IC_{50} -Werte gemessen. Es handelt sich hier um die Inhibitorkonzentration, bei der die Aktivität des Enzyms auf 50 % abgesunken ist.

Dazu werden die Anfangsgeschwindigkeiten bei konstanter Enzym- und Substrat-, jedoch variierender Inhibitorkonzentration gemessen.

Die Geschwindigkeit in Abhängigkeit der logarithmischen Inhibitorkonzentration hat einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Der IC_{50} -Wert entspricht der Inhibitorkonzentration am Wendepunkt.

3.3.2.2. UV/Vis-Spektroskopie

Alle optischen spektroskopischen Methoden beruhen auf der Eigenschaft von Molekülen, elektromagnetische Strahlung bestimmter Energie bzw. Wellenlänge zu absorbieren, zu streuen oder zu emittieren. ^[120]

Die Absorption von Photonen wird durch das *Lambert-Beer'sche* Gesetz quantifiziert.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (11)$$

A: Absorption, I_0 : Intensität der einfallenden Strahlung, I: Intensität der austretenden Strahlung,
 ε : molarer Extinktionskoeffizient, c: Konzentration der Probe, d: Schichtdicke der Probenlösung.

Die Gültigkeit des Gesetzes hängt von nachstehenden Faktoren ab: Die Substanz muss homogen in Lösung verteilt sein, es dürfen weder Lichtstreuung noch Photoreaktionen in der Lösung vorliegen.

Wird die Absorption in Abhängigkeit der Wellenlänge aufgetragen, erhält man das zur vermessenen Substanz gehörige Absorptionsspektrum. Absorbieren mehrere Komponenten in einer Probe, so überlagern sich die Absorptionsspektren.

Zeitaufgelöste Messungen sind notwendig, um bei biochemischen Reaktionen Aussagen über Anfangs- und Endzustand der Reaktion sowie über die Reaktionsgeschwindigkeit treffen zu können. Dazu wird die Absorption bei einer festen Wellenlänge als Funktion der Zeit gemessen. Das Entstehen von Produkten oder der Zerfall von Substraten kann auf diese Weise verfolgt werden.

3.3.2.3. Fluoreszenzspektroskopie

Beim Übergang $S_1, v = 0 \rightarrow S_0, v = 1$ wird ein Lichtquant emittiert. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Da bei der Fluoreszenz die Energie des eingestrahlten Lichts immer größer ist als die des Emittierten, ergeben sich einige charakteristische Eigenschaften für Fluoreszenz:

Das Fluoreszenzspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum hin zu größeren Wellenlängen verschoben.

Das Emissionsspektrum ist unabhängig vom Absorptionsspektrum.

Die Spektrenstruktur wird durch die Schwingungsniveaus bestimmt: Das Absorptionsspektrum wird durch die Schwingungsunterstruktur von S_1 geprägt, das Emissionsspektrum durch die Struktur von S_0 .

Die Fluoreszenzintensität hängt von der Konzentration des untersuchten Moleküls ab:

$$F = I_0 \cdot \phi \cdot (2.303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d) \quad (12)$$

F: Fluoreszenzintensität, I_0 : Intensität des eingestrahlten Lichts, Φ : Verhältnis emittierter zu absorbierten Photonen, ε : molarer Extinktionskoeffizient, c: Konzentration, d: Schichtdicke.

Bei fluoreszenzspektroskopischen Experimenten mit Biomolekülen wird unterschieden zwischen intrinsischer Fluoreszenz, bei der das Fluorophor Teil des Biomoleküls ist, und extrinsischer Fluoreszenz, bei der Fluoreszenz-Sonden zugegen sein müssen. Häufig verwendete Fluoreszenzsonden sind Fluorescein-, Coumarin- und Dansylderivate.

3.3.3. Chymotrypsin

Chymotrypsin ist eines der proteinolytischen Enzyme im Verdauungssystem, die Peptidbindungen selektiv auf der carboxyterminalen Seite hydrophober Aminosäuren spalten.

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur 1967 ^[121] zeigte eine kugelförmige Struktur aus drei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Eine für Serinproteasen typische Anordnung der Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin (katalytische Triade) findet sich im aktiven Zentrum.

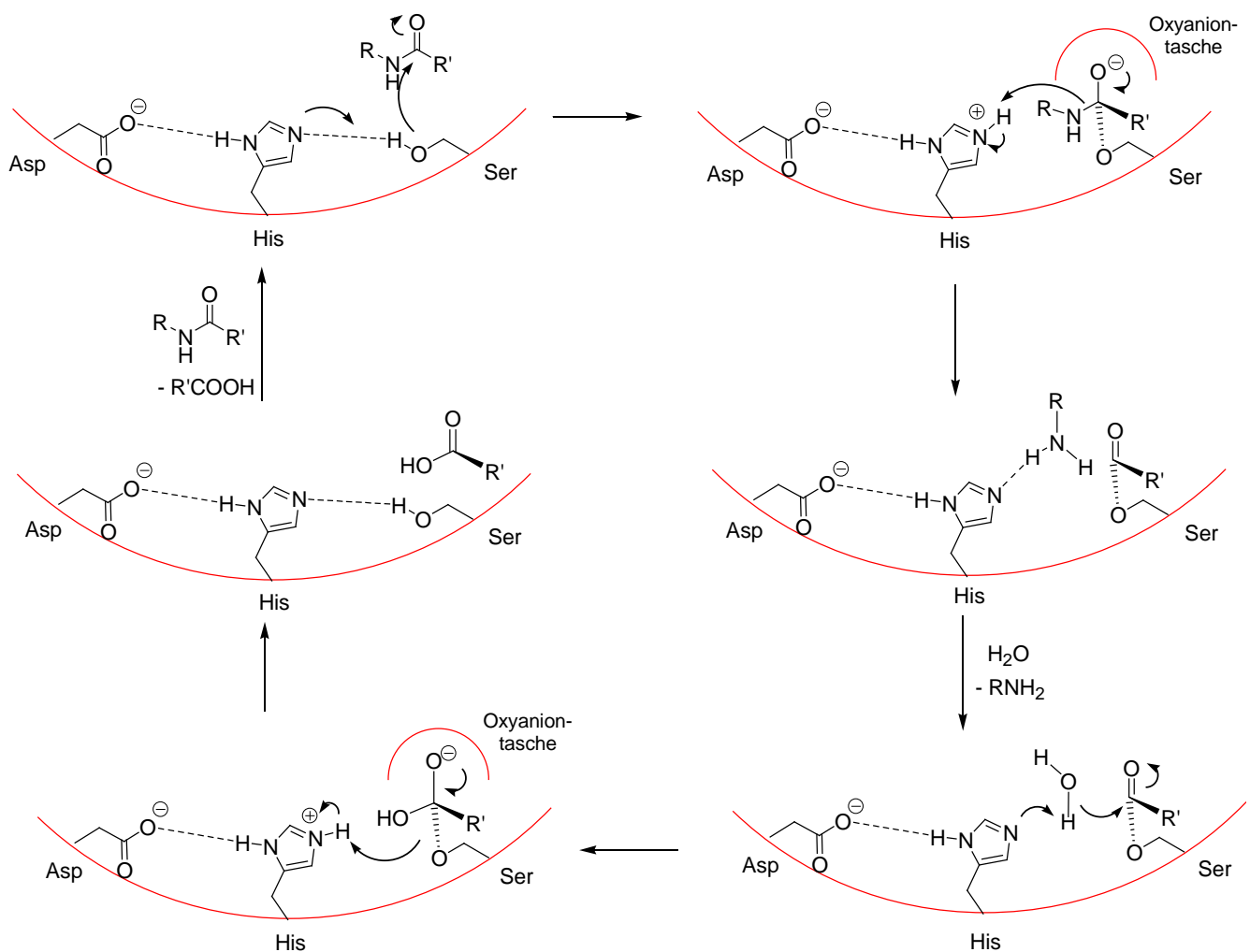


Abb. 3.35: Die katalytische Triade: In Chymotrypsin aktivieren die Reste Asp 102 und His 57 das Ser 195 zu einem starken Nucleophil. ^[118]

Durch die Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Asp 102 und dem His 57 wird die Orientierung des Histidins unterstützt, die elektrostatischen Effekte

machen es zu einem besseren Protonenakzeptor. Der Histidinrest wirkt als Basenkatalysator: Er deprotoniert die Hydroxylgruppe des Ser 195 und lässt ein stark nucleophiles Alkoxidion entstehen.

Die proteolytische Spaltung des Substrats zwischen aromatischen Aminosäuren erfolgt durch Aktivierung der wenig reaktiven Carbonylgruppe durch kovalente Verknüpfung mit dem reaktiven Serinrest. Die tetraedrischen Zwischenprodukte werden durch Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen des Gly 193 und des Ser 195 sowie dem negativ geladenen Sauerstoffatom des Substrats in der Oxyaniontasche stabilisiert.

Chymotrypsin wird als inaktives Precursorprotein (Chymotrypsinogen) gebildet, um den Abbau zellulärer Proteine zu verhindern und die Enzymaktivität nach Bedarf zu regulieren. Chymotrypsinogen wird aus dem Pankreas in den Zwölffingerdarm ausgeschüttet und gelangt in Dün- und Dickdarm und in die Blutbahn. Wenn es die Verdauung erfordert, wird Chymotrypsinogen extra- oder subzellulär proteolytisch gespalten.

Chymotrypsin besteht aus drei über Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten (1.2 kDa, 13.9 kDa, 10 kDa) und ist mit dem pI-Wert 8.75 ein basisches Enzym. ^[122]

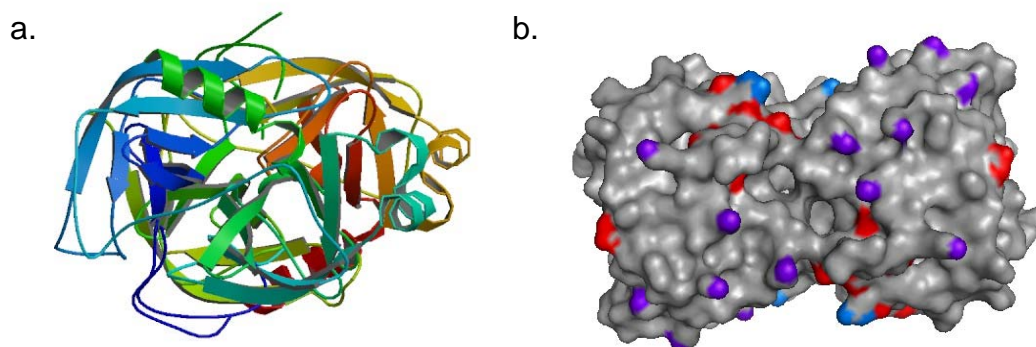


Abb. 3.36: Struktur von α -Chymotrypsin (pdb: 4cha): **a.** Sekundärstrukturelemente, **b.** Oberfläche (rot: Asp, Glut; blau: Arg; violett: Lys).

Die proteolytische Aktivität von Chymotrypsin bezieht sich insbesondere auf Peptidbindungen C-terminal von Tyrosin. Diese Selektivität wird zur Messung der

Chymotrypsinaktivität ausgenutzt. Als Substrat dient *N*-Benzoyl-L-Tyrosin-*p*-nitroanilin, dessen C-terminale Peptidbindung bei Zugabe von Chymotrypsin hydrolytisch gespalten wird.

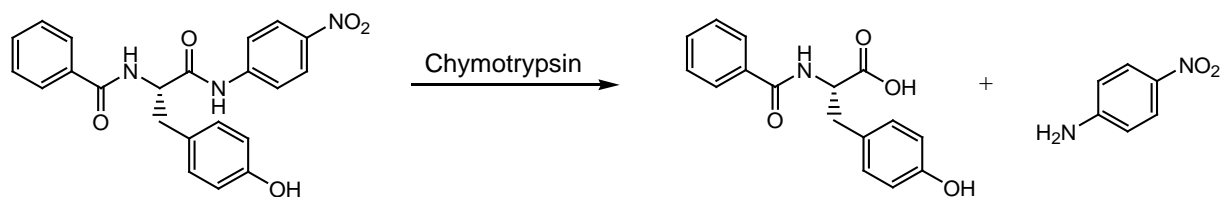


Abb. 3.37: Hydrolytische Spaltung von *N*-Benzoyl-L-Tyr-*p*-nitroanilin durch Chymotrypsin.

Im UV/Vis-Spektrum sieht man im Vergleich zum Substrat einen deutlichen Anstieg der Absorption zwischen 300 nm und 450 nm mit einem Maximum bei ca. 405 nm. Es ist eine Farbänderung von farblos nach gelb zu beobachten.

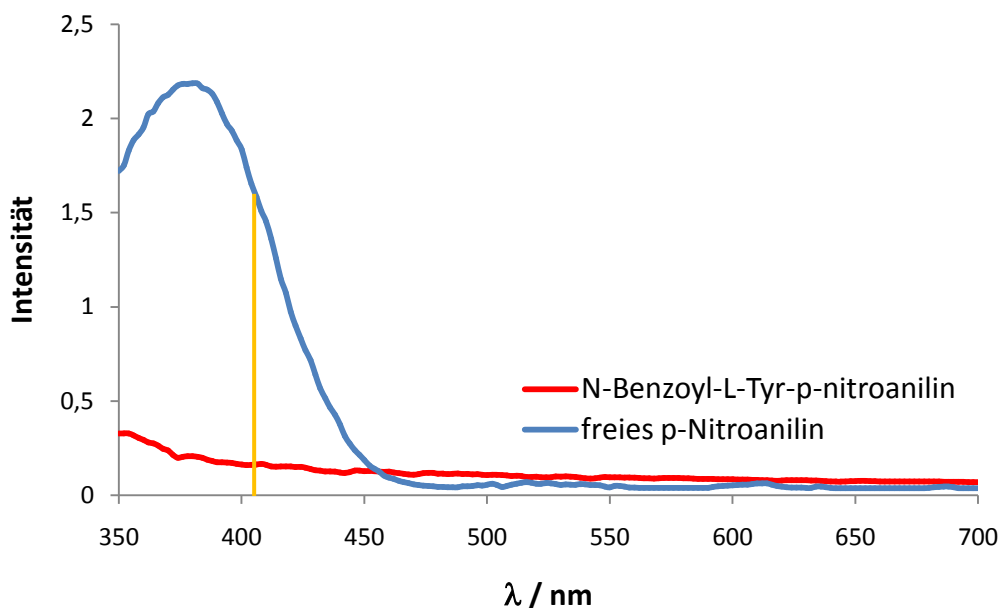


Abb. 3.38: UV-Übersichtsspektrum von *N*-Benzoyl-L-Tyr-*p*-nitroanilin (rot) und freigesetztem *p*-Nitroanilin (blau).

Entgegen der Annahme, die Inhibierung von Chymotrypsin sollte aufgrund des stark basischen pI-Wertes mit BP-haltigen Polymeren erfolgen, zeigte das Screening keine aktivitätseinschränkende Effekte dieser Polymere. Ursache könnte die hohe Lysin-Dichte auf der Oberfläche sein. Die Bisphosphonat-Reste binden Ammonium-Ionen deutlich schlechter als Guanidinium-Ionen und somit auch Lysin-Reste schlechter als

Arginin-Reste. Genauere Hinweise, ob überhaupt eine Bindung erfolgt, würden Bindungskonstantenbestimmungen durch Fluoreszenztitrationen erbringen.

Die Substratspezifität des Chymotrypsins lässt eine Aktivitätsbeeinflussung durch Phe-haltige Polymere vermuten. Doch auch diese Polymere konnten das Enzym nicht inhibieren, und es zeigte volle Aktivität gegenüber seinem Substrat. Die Bindung des Phe-Restes könnte aus verschiedenen Gründen unmöglich sein: Einerseits kann die Nähe zum Polymerrückgrat problematisch sein. Andererseits könnte das Substratmimetikum auch als Substrat fungieren. Chymotrypsin kann auch am C-terminalen Ende von Aminosäuren Esterbindungen spalten. Sollte das substratmimetische Monomer in der S_1 -Tasche gebunden werden, würde der C-terminale Methylester gespalten und der ungeschützte Phe-Rest aus dem aktiven Zentrum entlassen. Ein Substratmolekül könnte die freie Bindungstasche neu besetzen, die Aktivität würde nicht verringert.

Da bei keinem der getesteten Polymere eine Inhibierung der Aktivität beobachtet werden konnte, wurde das Chymotrypsin mit dem literaturbekannten Inhibitor Aprotinin getestet. Aprotinin ist ein 58 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 6.5 kDa. Aprotinin inhibiert kompetitiv Serinproteasen durch eine stabile 1:1-Komplexierung im aktiven Zentrum der Proteasen.

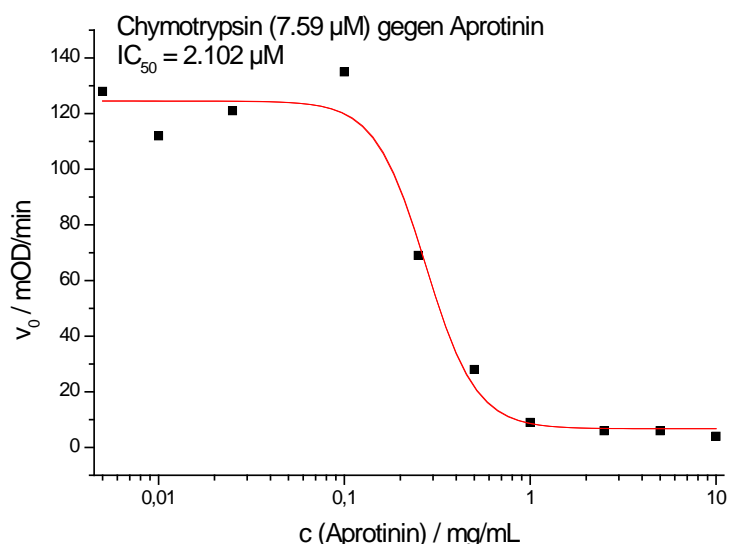


Abb. 3.39: IC_{50} -Kurve: Chymotrypsin gegen Aprotinin.

Der IC_{50} -Wert mit Aprotinin liegt bei 2.1 μM , eine vollständige Inhibierung liegt bei äquimolaren Mengen vor.

Dieser Versuch belegt, dass nicht aufgrund eines falsch verlaufenden Enzymassays keine Inhibierung durch die Polymere erzielt werden kann.

3.3.4. Trypsin

Trypsin ist ein weiteres im Dünndarm vorkommendes Verdauungsprotein, dessen Aminosäuresequenz zu bis zu 40 % mit der des Chymotrypsins übereinstimmt.^[118] Es gehört zur Klasse der Serinproteasen.

Trypsin wird als inaktive Zymogenvorstufe vom Pankreas ausgeschüttet und von Enteropeptidasen im Dünndarm in Trypsinogen gespalten. Bei Bedarf kann sich Trypsin selbst aktivieren (positive Rückkopplung) und auch andere inaktive Enzymvorstufen spalten.

Das pH-Optimum von Trypsin liegt im basischen Bereich bei 7-8, das Molekulargewicht beträgt 24 kDa.

Trypsin besitzt als Serinprotease die katalytische Triade Asp – His – Ser im aktiven Zentrum.^[123] Die Substratspezifität für proteolytische Spaltungen am C-Terminus von Argininen und Lysinen wird durch einen Aspartatrest in der Substratbindungstasche gewährleistet. Der Aspartatrest kann die positiven Seitenketten über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen binden.^[124, 125]

Die katalytische Triade ist zwischen zwei Domänen aus sechsträngigen β -barrels, das sind fassartige Strukturen, angeordnet. Das Histidin und das Aspartat des aktiven Zentrums gehören zur N-terminalen Domäne; das Serin, die Oxyaniontasche und die Substratbindungstasche liegen in der C-terminalen Domäne.^[126]

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist die Bildung des Acylenkomplexes. Die Katalyseaktivität wird durch die Bindung der Substratseitenkette und die damit einhergehende leichte Konformationsänderung gesteigert.^[127]

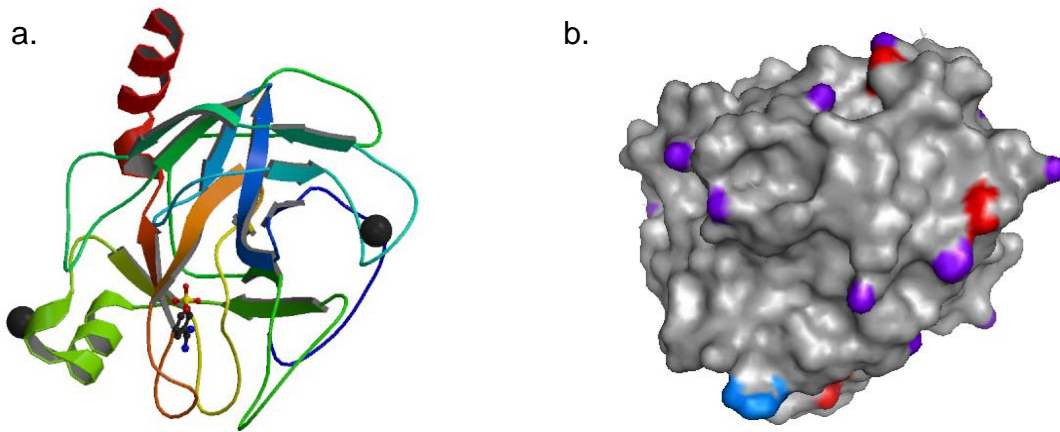


Abb. 3.40: Struktur von Trypsin (pdb: 1ce5): **a.** Sekundärstrukturelemente von Trypsin im Komplex mit Benzamidin, **b.** Oberfläche (rot: Asp, Glut; blau: Arg; violett: Lys).

Die Spezifität von Trypsin, Peptidbindungen hinter Arginin zu spalten, wird bei der Messung der Trypsinaktivität ausgenutzt.

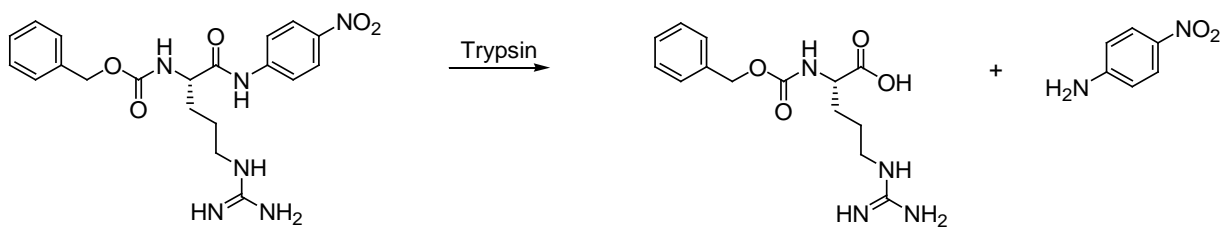


Abb. 3.41: Hydrolytische Spaltung von BAPNA durch Trypsin.

Das zunächst farblose Substrat *N*-Benzoyl-L-arginin-*p*-nitroanilin (BAPNA) setzt nach der hydrolytischen Spaltung das intensiv gelbgefärbte *p*-Nitroanilin frei. Im UV-Spektrum ist beim Vergleich des gespaltenen mit dem ungespaltenen Substrat ein deutlicher Intensitätsanstieg oberhalb von 400 nm zu beobachten.

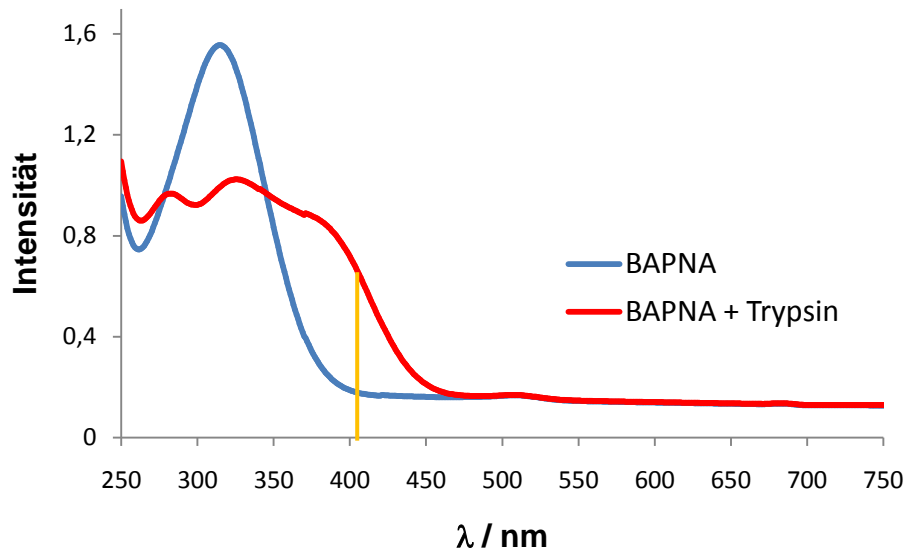


Abb. 3.42: UV-Übersichtsspektrum von BAPNA (blau) und von freiem p-Nitroanilin (rot).

Im Screening der Polymere mit Trypsin sollten aufgrund der hohen positiven Ladungsdichte auf der Oberfläche starke Effekte mit BP-haltigen Polymeren erzielt werden. Die Polymere **3**, **5**, **12** und **33** zeigten zwar eine aktivitätseinschränkende Wirkung, allerdings konnte nur das Polymer **3** das Trypsin vollständig inhibieren.

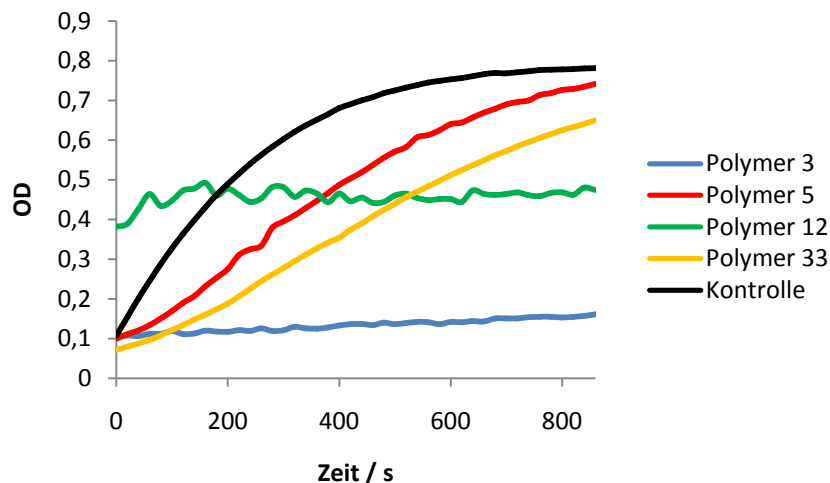


Abb. 3.43: Screening der Polymere mit Trypsin.

Andere BP-haltige Polymere zeigten keinen Einfluss auf die Trypsin-Aktivität, selbst bei einem Überschuss an BP-Monomer im Polymer. Diese Selektivität einzelner Polymere kann einerseits durch die Bindung der anderen enthaltenen Monomere, andererseits durch die räumliche Anordnung der Polymerkette begründet werden.

Der IC_{50} -Wert mit Polymer **3**, das aus fünf Äquivalenten BP-Monomer **6** und je einem Äquivalent der Monomere **2** (Glucose) und **5** (Dodecyl) besteht, lag bei $1.99 \mu\text{M}$, einer substöchiometrischen Menge an Polymer in Bezug auf Trypsin.

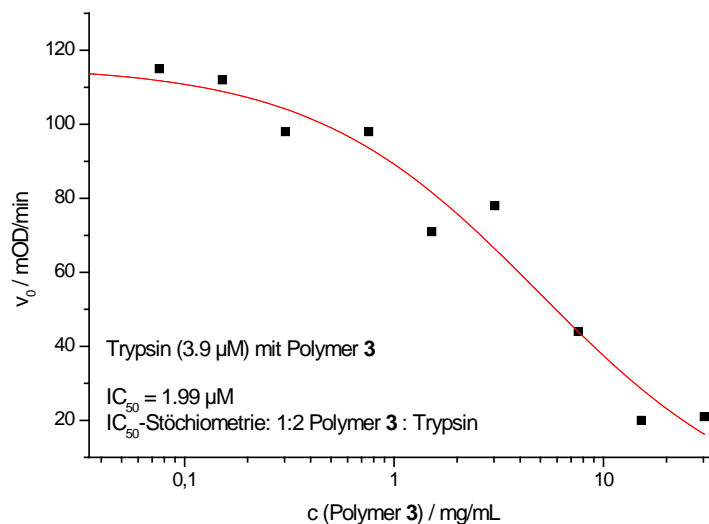


Abb. 3.44: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **3**.

Mit den Polymeren **5**, **12** und **33** konnten keine IC_{50} -Werte bestimmt werden, da ihr Einfluss auf das Trypsin zu schwach ist.

Da Trypsin Peptidbindungen hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet, wurde als Substratmimetikum das Lys-Monomer **13** getestet. Zur Verstärkung der inhibitorischen Wirkung wurden Polymere hergestellt, die wie die Polymere **3**, **5**, **12** und **33** aufgebaut waren und zusätzlich ein Äquivalent des Lys-Monomers **13** trugen. Diese Polymere **59-62** zeigten jedoch in Inhibierungsassays keine aktivitätseinschränkende Wirkung auf das Trypsin. Das Problem bei der Verwendung dieser Polymere könnte die Kombination von BP- und Lys-Monomer sein: Die Ammonium-Gruppen der Lysin-Seitenkette können durch die BP-Pinzetten chelatisiert werden. Dadurch liegen keine freien Lysin-Reste vor und eine Bindung von Lysin im aktiven Zentrum ist nicht möglich. Außerdem sind in den Polymeren weniger freie BP-Reste zur Bindung auf der Enzymoberfläche verfügbar, und eine Verschlechterung der inhibitorischen Eigenschaften ist zu erwarten. Bei Polymer **62** liegen BP- und Lys-Monomer äquimolar vor, so dass vermutlich keine freien funktionellen Reste im Polymer vorliegen und keine Inhibierung erfolgen kann.

Für die Untersuchung des Einflusses des Lys-Monomers **13** wurden in Polymer **64** die Monomere **2**, **6**, **9** und **13** (1:1:1:3) copolymerisiert. Die Bindung von nicht durch Lysin-Seitenketten komplexierten BP-Resten kann zur Bindung des Polymers auf der Oberfläche führen. Der Überschuss an Lys-Monomer sollte für freie Lysin-Seitenketten sorgen, die das Polymer im und um das aktive Zentrum herum lokalisieren sollten, um eine Inhibierung herbeizuführen. Eine Einschränkung der Aktivität konnte jedoch nicht beobachtet werden. Problematisch könnte der ungeschützte C-Terminus des Monomers **13** sein: Nach der Substratspaltung werden die Lys- und Arg-Reste mit freier C-terminaler Carboxylat-Funktion aus dem aktiven Zentrum entlassen. Dieser Effekt könnte dazu führen, dass das Lysin-Monomer **13** mit seiner freien Carboxylat-Funktion nicht im aktiven Zentrum als Substratmimetikum gebunden wird und daher keinen Einfluss auf die Trypsinaktivität zeigt.

Neben diesen Polymeren wurden die Polymere **55-58** getestet: Diese Polymere tragen ein Äquivalent des Phe-Monomers **14** als Substratmimetikum für Cathepsin D. Das Polymer **57**, was neben dem Phe-Monomer **14** Polymer **3** entspricht, zeigte keine inhibitorische Wirkung auf Trypsin. Polymer **56**, bestehend aus fünf Äquivalenten BP-Monomer, drei Äquivalenten NTA- und je einem Äquivalent Phe- und Glucose-Monomer, inhibiert Trypsin mit einem IC_{50} -Wert von 589 nM deutlich besser als das Polymer **3**.

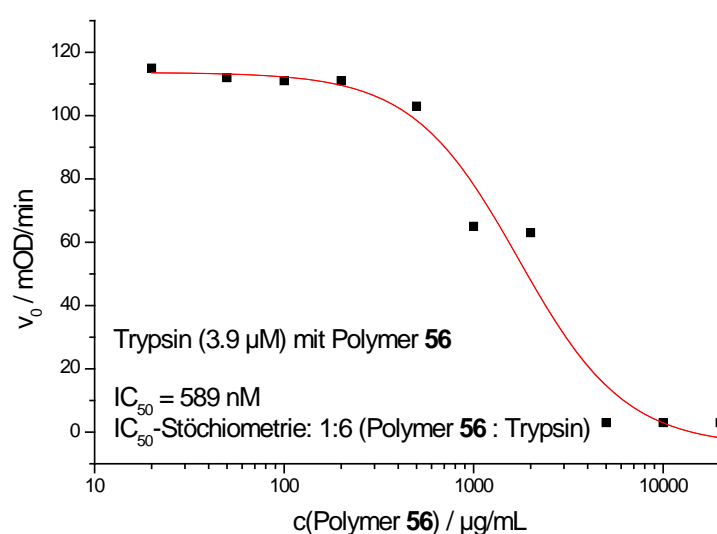


Abb. 3.45: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **56**.

Der starke Einfluss des NTA-Monomers allein im Polymer **56** kann allerdings nicht erklärt werden.

Polymer **53**, das dem Polymer **3** mit drei Äquivalenten Phe-Monomer **14** entspricht, inhibiert Trypsin mit einem IC_{50} -Wert von 780 nM in substöchiometrischer Konzentration. Die Phe-Reste können durch π -Stapel-Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren und π -Kation-Wechselwirkungen mit Lysin- und Arginin-Resten auf der Oberfläche des Trypsins gebunden werden. Diese Wechselwirkungen können die Bindung des Polymers verstärken und führen zu einer 2.5-fach kleineren benötigten Inhibitorkonzentration.

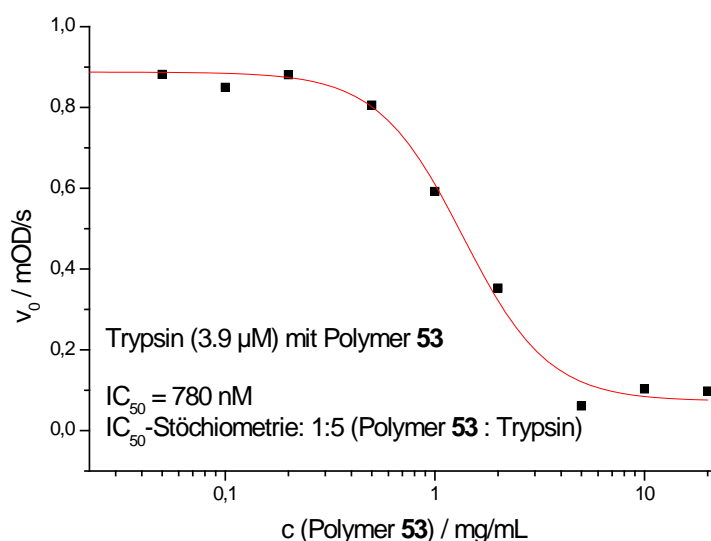


Abb. 3.46: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **53**.

Die Copolymerisation des substratmimetischen Lys-Monomers führten zu keiner Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften der Polymere.

Phe-Reste zeigten hingegen in zwei Polymeren deutliche Einflüsse auf die Trypsinaktivität: Die Inhibitorkonzentrationen wurden bis zu dreifach verringert. Bemerkenswert ist die Steilheit der Kurven um den IC_{50} -Wert: Mit Polymer **3** wird eine Inhibierungskurve mit sehr schwacher Steigung erreicht. Eine vollständige Inhibierung ist daher erst mit Polymerkonzentrationen ab 9.5 μ M möglich. Die Phe-haltigen Polymere zeigen eine vollständige Inhibierung schon bei 1.7 μ M (Polymer **56**) und 2.8 μ M (Polymer **53**).

Alle drei Inhibitoren hemmen das Enzym in substöchiometrischen Konzentrationen. Dieser Effekt könnte auf die Molekülgrößen zurückgeführt werden: Trypsin ist mit einem Molekulargewicht von 24 kDa ein kleines Protein, die Polymergewichte liegen bei 80-135 kDa deutlich höher. Möglicherweise können daher mehrere Proteine von einem Polymer gebunden werden.

Tab. 3.4: Inhibitoren von Trypsin.

Polymer	Zusammensetzung	IC ₅₀ / μ M	Verhältnis Polymer : Trypsin
3	6 / 5 / 2 (5:1:1)	1.99	1:2
53	6 / 5 / 2 / 14 (5:1:1:3)	0.78	1:5
56	6 / 8 / 2 / 14 (5:3:1:1)	0.59	1:6

3.3.5. Cathepsin D

Cathepsine bilden die Klasse der lysosomalen Hydrolasen, die bei sauren pH-Werten Peptidbindungen in Proteinen spalten. Die Cathepsine werden je nach katalytischer Wirkung in die Cystein-, Serin- und Aspartat-Proteasen eingeteilt. ^[128]

Cathepsin D (CatD) zählt zur Klasse der Aspartat-Proteasen ^[129] und spaltet selektiv zwischen aromatischen Aminosäuren. Sein pH-Optimum liegt bei 3.

Der allgemein anerkannte mechanistische Vorschlag geht von einer Koordination eines Wassermoleküls zwischen den beiden katalytisch aktiven Asp-Resten aus. Durch die Abspaltung eines Protons des Wassers, kann dieses am Carbonyl-Kohlenstoffatom einer Amidbindung nucleophil angreifen. Durch Deprotonierung des einen Aspartats wird die Amidbindung gespalten.

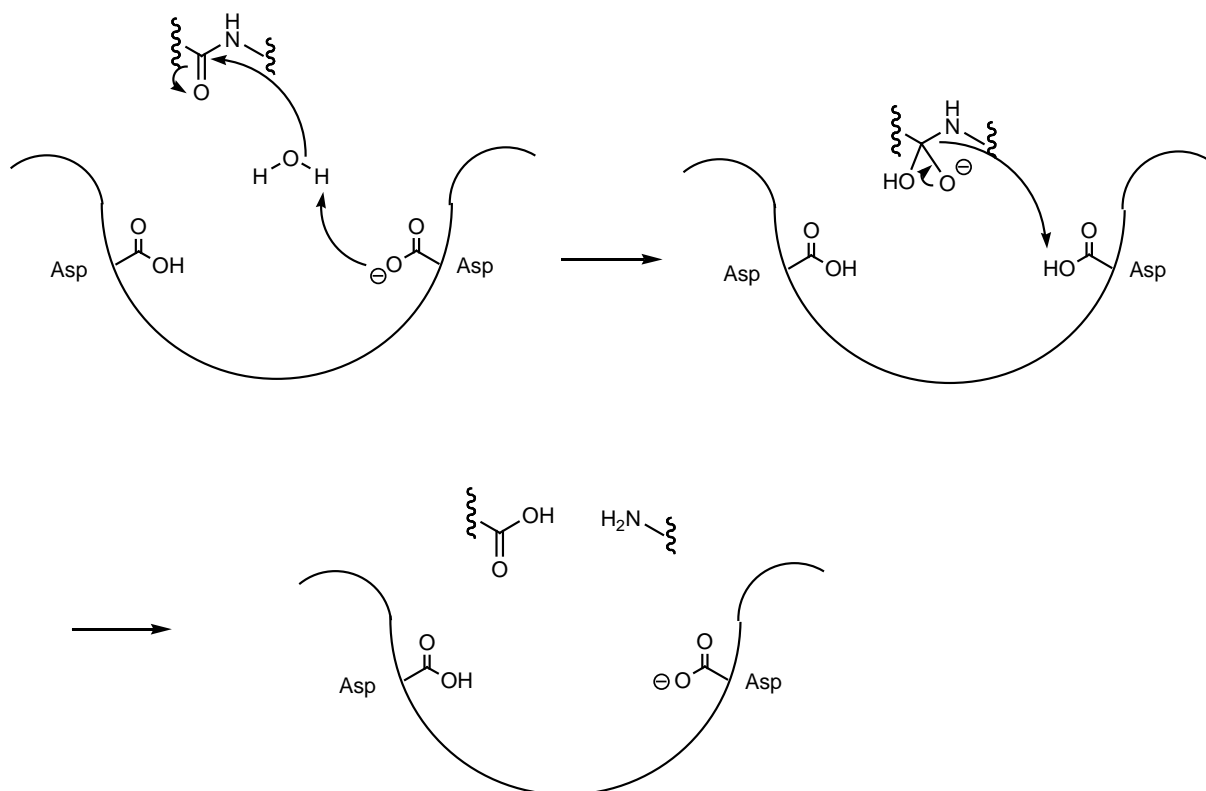


Abb. 3.47: Peptid-Spaltung durch Aspartat-Proteasen. ^[129]

Das CatD wird als Präprocathepsin D synthetisiert ^[130] und mehrmals proteolytisch gespalten. Der Mechanismus ist bislang ungeklärt. Eine 48 kDa große Intermediärform wird zu der reifen Form mit einer kleinen aminoterminalen (14 kDa) und einer großen carboxyterminalen (34 kDa) Kette umgebaut.

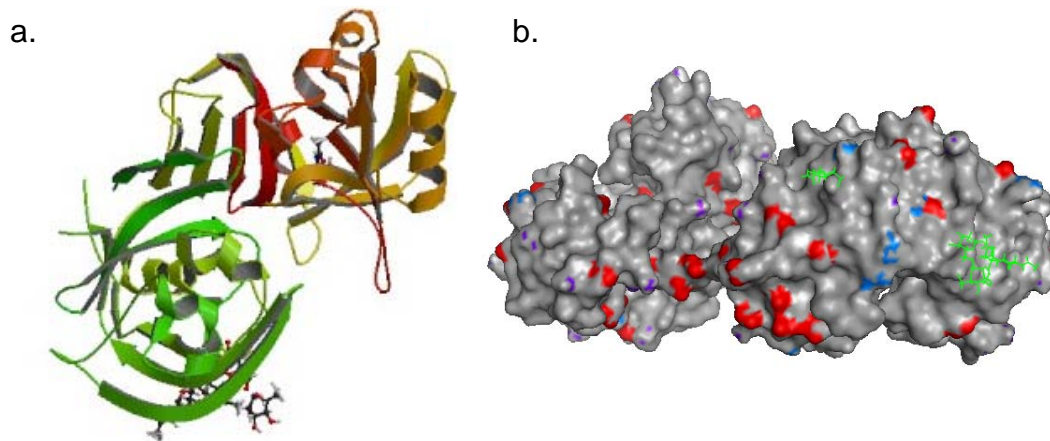


Abb. 3.48: Struktur von CatD im Komplex mit Pepstatin (pdb: 1lya):

a. Sekundärstrukturelemente, b. Oberfläche (rot: Asp, Glut; blau: Arg; violett: Lys).

Die biologische Rolle von CatD ist variabel. CatD ist mit apoptotischen Ereignissen verbunden, kann Apoptose verhindern oder induzieren, z.B. durch Freisetzung von Cytochrom C (CytC) aus den Mitochondrien oder den Verlust des Transmembranpotentials ($\Delta\Psi$).^[131] Auch eine Beteiligung in Alterungsprozessen^[132, 133] und der Alzheimer'schen Krankheit^[134, 135] wird diskutiert. In Brustkrebszellen wird CatD überexprimiert, das Metastase-Risiko steigt mit der Menge an CatD. Es wird daher zur Diagnose und Prognose von Brustkrebs als Tumormarker verwendet.^[136, 137]

Cathepsin D (CatD) spaltet spezifisch die Peptidbindung zwischen aromatischen Aminosäuren.^[138] Die Aktivität des CatD wird über die Hydrolyse eines peptidischen Substrats nachvollzogen.

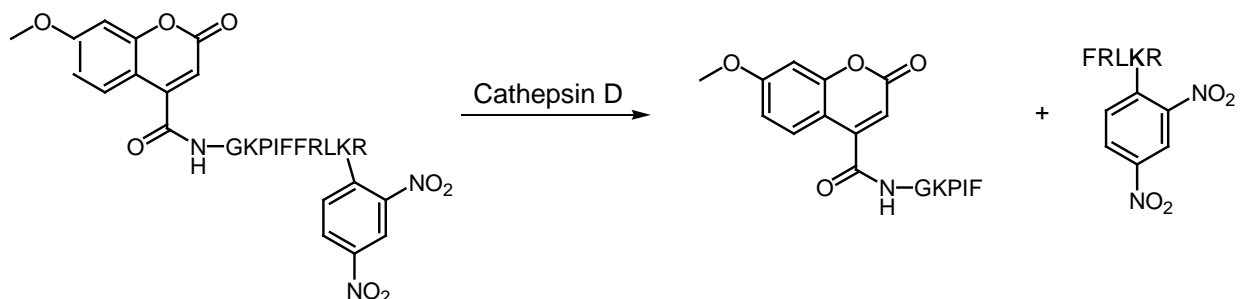


Abb.3.49: Hydrolytische Spaltung von MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂.^[138]

Das peptidische Substrat ist kovalent mit zwei Farbstoffen verknüpft, deren Fluoreszenzaktivität intramolekular gequencht ist. Nach der Spaltung liegt das

Coumarinderivat ungequencht vor. Es besitzt nach der Anregung bei 328 nm sein Emissionsmaximum bei 393 nm.

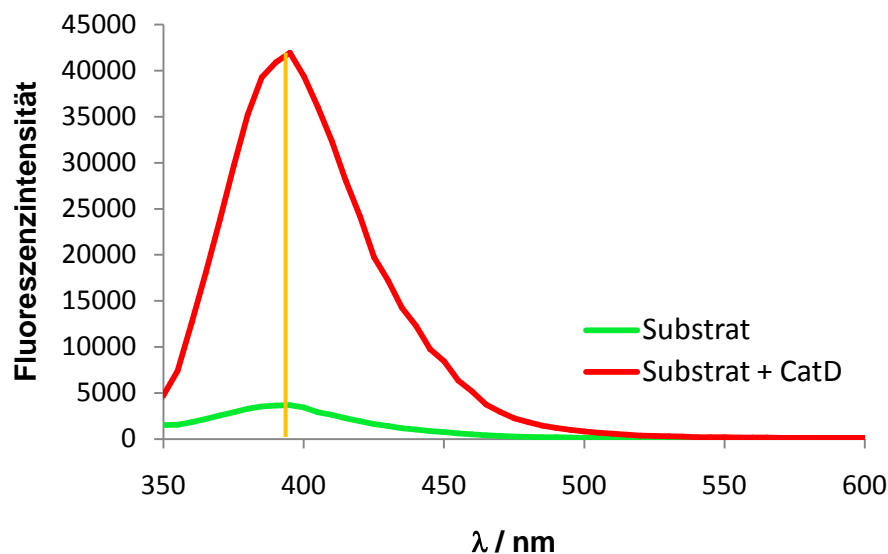


Abb. 3.50: Fluoreszenzspektren (Extinktion: 328 nm, Emission: 393 nm): rot: ungespaltenes Substrats (MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂); grün: gespaltenes Substrats (MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Phe).

Bei CatD, einem sauren Protein, würden starke Effekte mit CBS-haltigen Copolymeren erwartet werden. Jedoch konnten keine inhibitorischen Eigenschaften dieser Polymere nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist der Einfluss des Puffermediums auf die Oberfläche. Bei einem pH-Wert von 4.0 liegen die sauren Aminosäuren Asp und Glu größtenteils ungeladen vor. Die Bindungskonstante zwischen CBS und ungeladener Carbonsäurefunktion ist im Vergleich zur Carboxylatbindung sehr klein.

Umso erstaunlicher ist die starke Hemmung, die bei Zugabe BP-haltiger Copolymere zu beobachten ist. Es kann jedoch nur mit Copolymeren mit hohem BP-Anteil eine Verringerung der CatD-Aktivität beobachtet werden.

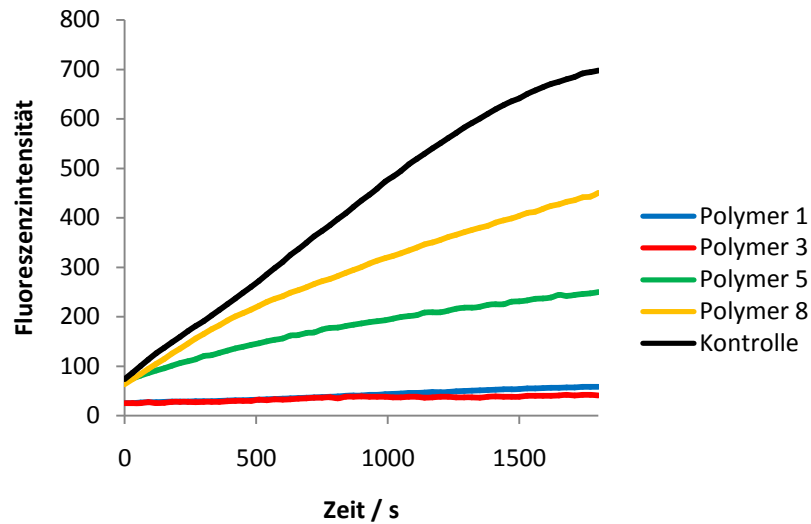


Abb. 3.51: Screening der Polymere **1**, **3**, **5** und **8** mit CatD.

Auf seiner Oberfläche trägt CatD zwar deutlich weniger basische als saure Aminosäuren, die Arginin- und Lysin-Reste liegen jedoch bei pH 4 nicht deprotoniert vor, so dass eine Bindung durch BP-haltige Copolymere möglich ist.

Einen starken Einfluss auf die enzymatische Aktivität des CatD zeigen auch NTA-haltige Copolymere.

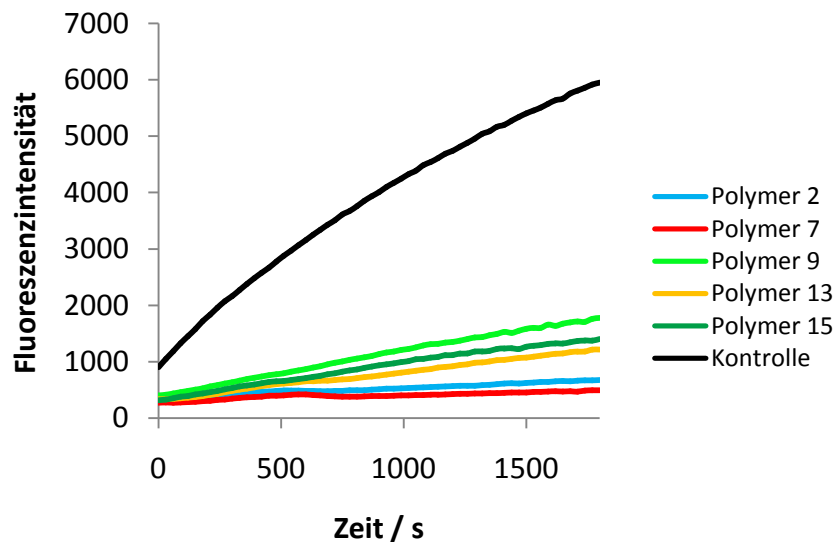


Abb. 3.52: Screening der Polymere **2**, **7**, **9**, **13** und **15** mit CatD.

Nicht mit allen NTA-haltigen Polymeren kann eine vollständige Inhibierung des CatD erreicht werden, aber es ist mit allen eine starke Verringerung der Aktivität zu

beobachten. Die Kombination mit mehreren Äquivalenten BP-Monomer ist besonders effektiv.

Im Screening mit CatD zeigten die Polymere **1**, **2**, **3** und **7** die stärkste inhibitorische Wirkung, wenn sie im Überschuss zugegeben wurden. Zur Bestimmung von IC_{50} -Werten wurden Verdünnungsreihen der Polymere mit Konzentrationen zwischen 2 mg/mL und 2 μ g/mL getestet. In der Verdünnung inhibierten diese Polymere bis zu einer Konzentration von 500 μ g/mL CatD komplett. Bei weniger als 50 μ g/mL Polymer konnte keine Verringerung der Aktivität mehr beobachtet werden. Die IC_{50} -Werte liegen zwischen 60 und 100 nM. Für die molaren Verhältnisse zwischen CatD und Polymer bedeutet dies einen 20- bis 40-fachen Überschuss an Polymer. Aufgrund der hohen Enzymverdünnung ist eine substöchiometrische Menge an Enzym durchaus zu erwarten.

Die beste Inhibierung erzielte Polymer **1**, das aus BP-, Glucose- und Dansyl-Monomer (5:1:2) besteht, mit einem IC_{50} -Wert von 61 nM; das entspricht einem Verhältnis von 24:1 (Polymer **1** : CatD). Polymer **3**, zusammengesetzt aus BP, Dodecyl- und Glucose -Monomer (5:1:1), zeigt eine ähnlich starke inhibitorische Wirkung auf CatD. Der IC_{50} -Wert liegt bei 68 nM und einem Verhältnis von 26:1 (Polymer **3** : CatD).

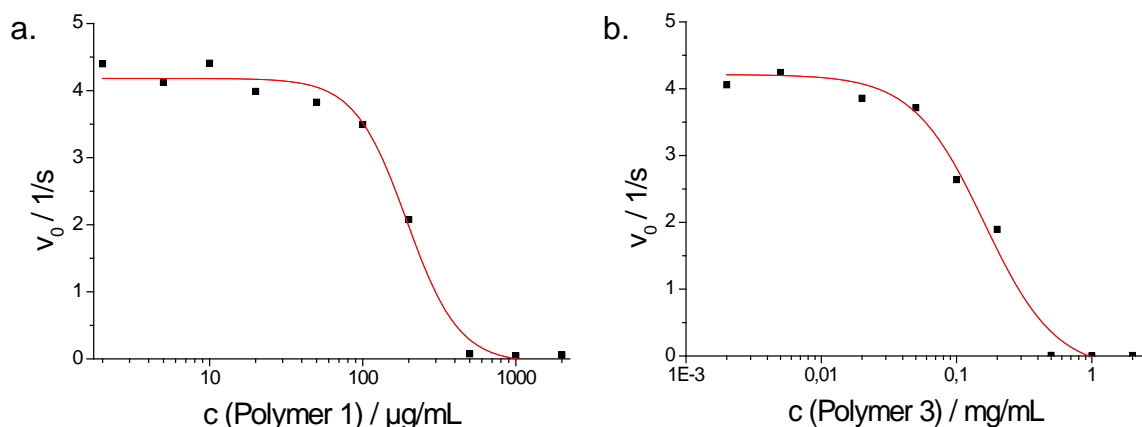


Abb. 3.53: Inhibierungskurven von CatD: **a.** mit Polymer **1**; **b.** mit Polymer **3**.

Beide Polymere tragen einen hohen BP-Anteil (5 eq) sowie unpolare Reste. Die Oberfläche des CatD zeigt in der Nähe des aktiven Zentrums eine hohe Zahl hydrophober und aromatischer Aminosäuren, die mit den Dansyl- und Dodecyl-Resten der Polymere wechselwirken und eine Bindung verstärken können. Durch die

Nähe zum aktiven Zentrum kann der Zugang des Substrats blockiert und damit die Enzymaktivität eingeschränkt werden.

Die am stärksten inhibierenden NTA-haltigen Polymere waren das Polymer **2**, bestehend aus BP-, NTA- und Glucose-Monomer (5:3:1), und das Polymer **7**, das sich aus BP-, NTA-, Glucose- und Dansyl-Monomer (3:1:1:0.5) zusammensetzt. Beide Polymere besitzen einen hohen BP-Anteil, was Voraussetzung für die Inhibierung von CatD durch Polymere ist.

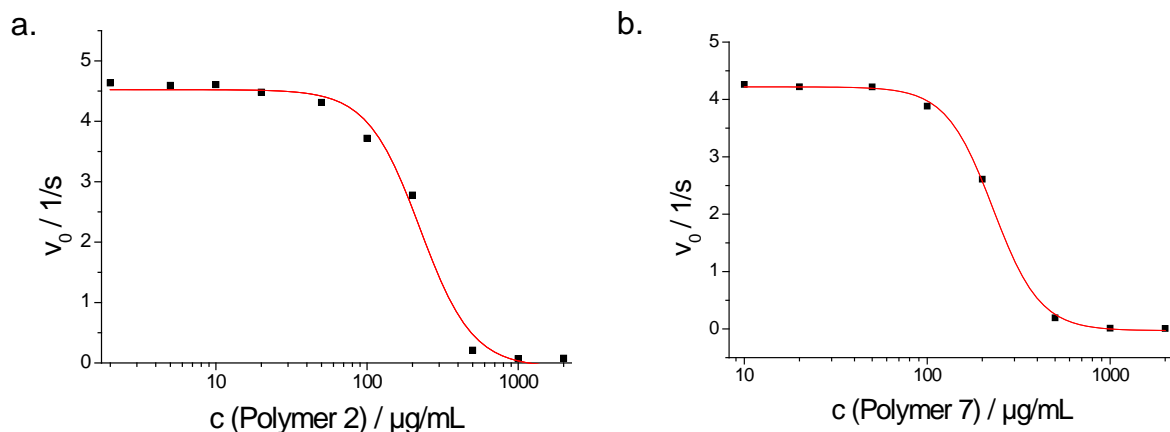


Abb. 3.54: Inhibierungskurven von CatD: **a.** mit Polymer **2**; **b.** mit Polymer **7**.

CatD weist lediglich ein Histidin, das nicht an der Oberfläche liegt, in seiner Sequenz auf. Bei CatD als Aspartat-Protease liegt dieser His-Rest auch nicht im aktiven Zentrum. Darum müssen Wechselwirkungen zwischen NTA und anderen Aminosäuren diskutiert werden. Durch Zugabe von Ni^{2+} -Ionen zu den Polymer-Lösungen entsteht der Ni^{2+} -NTA-Komplex, der starke Bindungen mit Histidin-Resten eingeht. Es ist denkbar, dass eine Chelatisierung von Ammonium- oder Guanidinium-Ionen das Ni^{2+} -Ion verdrängt und es zur Bindung von Lysin- und Arginin-Resten kommt.

Die substratmimetischen Monomere zeigen keine zusätzlichen inhibitorischen Eigenschaften.

Die IC_{50} -Werte verändern sich kaum durch ein Äquivalent des Phenylalanin-Monomers im Vergleich zu den mit den Polymeren **2** und **7** erzielten Inhibierungen. Es kann mit Polymer **56**, das aus Polymer **2** und einem Äquivalent Phe-Monomer **14** besteht, eine leichte Verbesserung der inhibitorischen Wirkung und mit Polymer **58**

aus Polymer **7** und einem Äquivalent Phe-Monomer **14** eine leichte Verschlechterung der inhibitorischen Wirkung beobachtet werden. Die inhibitorischen Eigenschaften der Polymere **1** und **3** sind deutlich besser als die der Polymere **55** und **57**, die jeweils zusätzlich ein Äquivalent des Phenylalanin-Monomers enthalten. Der Zusatz drei zusätzlicher Äquivalente Phe-Monomer zeigte zwar bessere Resultate als die Polymere mit nur einem Äquivalent Phe-Monomer, eine starke Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften konnte allerdings auch auf diesem Wege nicht erzielt werden.

Zwei mögliche Ursachen können diskutiert werden: Zunächst kann die räumliche Struktur des aktiven Zentrums Ursache sein. CatD spaltet spezifisch die Peptidbindung zwischen zwei aromatischen Aminosäuren. Die Phenylalanin-Reste liegen im Polymer jedoch einzeln vor, so dass die Bindung des Phenylalanin-Restes als Substratmimetikum unter Umständen nicht möglich ist. Darüberhinaus ist das Phenylalanin direkt am Polymerrückgrat gebunden. Aufgrund der sperrigen Reste der anderen Monomere kann ein tieferes Eindringen des Phenyl-Rings bis zur eigentlichen Bindungsstelle erschwert sein. Zum Anderen kann aufgrund von π -Stapel-Wechselwirkungen zwischen dem Phe-Rest und den BP- bzw. Dansyl-Resten die Bindung der Polymere an das CatD erschwert werden.

Auch die inhibitorischen Eigenschaften der Copolymere mit Lysin-Monomer, das als Substratmimetikum für Trypsin wirken sollte, wurden mit CatD getestet. So zeigten die Polymere **60** und **62**, die den Polymeren **5** und **33** mit jeweils einem Äquivalent des Lysin-Monomers **13** entsprechen, inhibitorische Effekte. Die Polymere **5** und **33** zeigten keine Inhibierung des CatD. Die IC_{50} -Werte lagen mit den Polymeren **60** und **62** deutlich höher (> 200 nM) als die IC_{50} -Werte, die mit den Polymeren **1**, **2**, **3** und **7** sowie mit den Phe-haltigen Polymeren **55** - **58** erzielt werden konnten. Diese Inhibitorwirkung einiger Lys-haltiger Polymere konnte nicht erwartet werden. Eine mögliche Erklärung bietet der Aufbau des Substrats: Dieses trägt in seiner Peptidkette jeweils drei Aminosäurereste vor und nach den beiden Phenylalanin-Resten ein Lysin. Möglicherweise können auch Lysin-Reste in der Nähe des aktiven Zentrums gebunden werden und das Substrat bzw. den Inhibitor vororientieren. Die Lysin-Reste könnten so die Bindung der Polymere in der Nähe des aktiven Zentrums begünstigen und die Substratbindung verhindern.

Tab. 3.5: Inhibitoren von Cathepsin D.

Polymer	Zusammensetzung	IC ₅₀ / nM	Verhältnis Polymer : CatD
1	6 / 2 / 3 (5:1:2)	61	24:1
2	6 / 8 / 2 (5:3:1)	64	25:1
3	6 / 5 / 2 (5:1:1)	68	26:1
7	6 / 8 / 2 / 3 (3:1:1:0.5)	95	37:1
55	6 / 2 / 3 / 14 (5:1:2:1)	308	121:1
56	6 / 8 / 2 / 14 (5:3:1:1)	55	22:1
57	6 / 5 / 2 / 14 (5:1:1:1)	135	53:1
68	6 / 8 / 2 / 3 / 14 (3:1:1:0.5:1)	124	49:1
52	6 / 2 / 3 / 14 (5:1:2:3)	109	43:1
53	6 / 8 / 2 / 14 (5:3:1:3)	41	16:1
54	6 / 5 / 2 / 14 (5:1:1:3)	111	44:1
63	6 / 8 / 2 / 3 / 14 (3:1:1:0.5:3)	81	32:1
60	6 / 9 / 2 / 13 (3:1:1:0.5:1)	232	91:1
62	6 / 9 / 2 / 13 (1:1:1:1)	603	237:1

3.3.6. Pankreaslipase

Die Pankreaslipase ist ein im Pankreas gebildetes Verdauungsenzym, das Fette im Dünndarm spaltet.

Dieses monomere Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa besteht aus 449 Aminosäuren. Die katalytische Triade in der *N*-terminalen Domäne der Lipase wird von Ser153, Asp176 und His263 gebildet.^[139] Im aktiven Zentrum liegt eine Oxyanionen-Höhle vor, wie sie auch in Serin-Proteasen häufig beobachtet wird. Ein Lid aus 23 Aminosäuren verschließt das aktive Zentrum, der Zugang wird durch die Colipase reguliert.^[140]

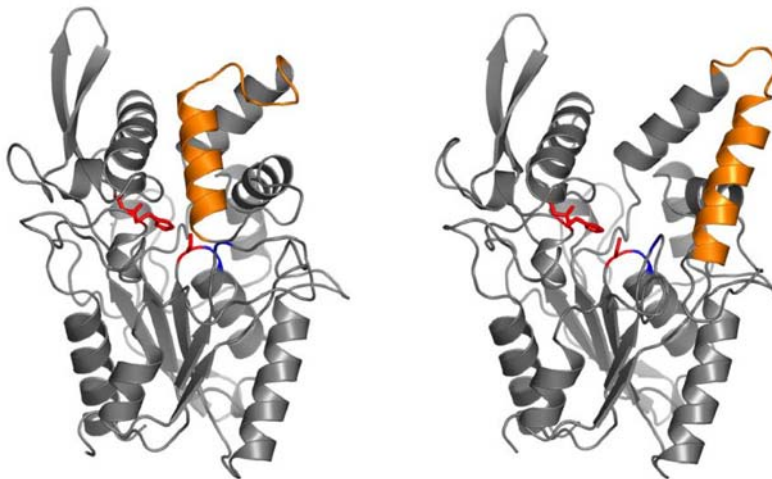


Abb. 3.55: **a.** geschlossene Form der Lipase, **b.** offene Form der Lipase. Das Lid ist in orange eingefärbt, die Oxyanionen-Höhle in blau und die katalytische Triade in rot. ^[141]

Der isoelektrische Punkt der Pankreaslipase liegt mit 5.37 im sauren Bereich. Auch die Analyse der Oberfläche zeigt überwiegend saure Aminosäuren.

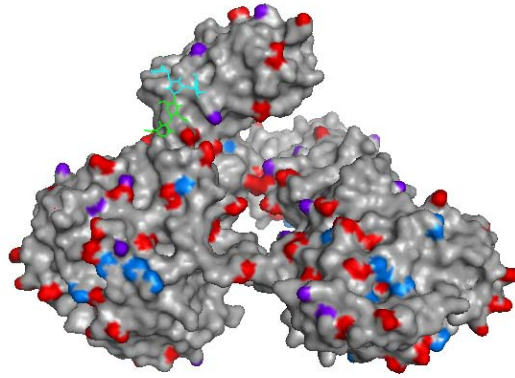


Abb. 3.56: Oberflächenstruktur (rot: Asp, Glut; blau: Arg; violett: Lys) der Pankreaslipase (pdb: 2oxe).

Die Pankreaslipase wird direkt als aktives Enzym im Pankreas gebildet und bei Bedarf in den Dünndarm ausgeschüttet. Die Bildung wird durch die Darmhormone Cholezystokinin und Sekretin sowie durch bei der Lipolyse gebildete freie Fettsäuren stimuliert.^[142-144] Ihre volle Aktivität besitzt die Pankreaslipase nur an der Grenzfläche von wässriger und fetthaltiger Phase und stellt daher keine klassische Esterase dar.^[145-147] Als Substrate dienen der Pankreaslipase ausschließlich Triglyceride aus aliphatischen Fettsäuren mit mindestens drei Kohlenstoffatomen. Unter optimalen Bedingungen können bis zu 700 Esterbindungen pro Sekunde gespalten werden.

Die Pankreaslipase spaltet Esterbindungen in Triglyceriden. Als Substrat wird *p*-Nitrophenylpalmitat (NPP), ein Mimetikum des natürlichen Substrats, verwendet.

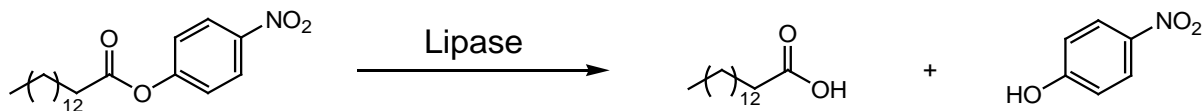


Abb. 3.57: Hydrolytische Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat durch Lipase.

Durch Hydrolyse des Esters wird *p*-Nitrophenol freigesetzt. Im UV-Spektrum liegt das Absorptionsmaximum von *p*-Nitrophenol bei ca. 410 nm.

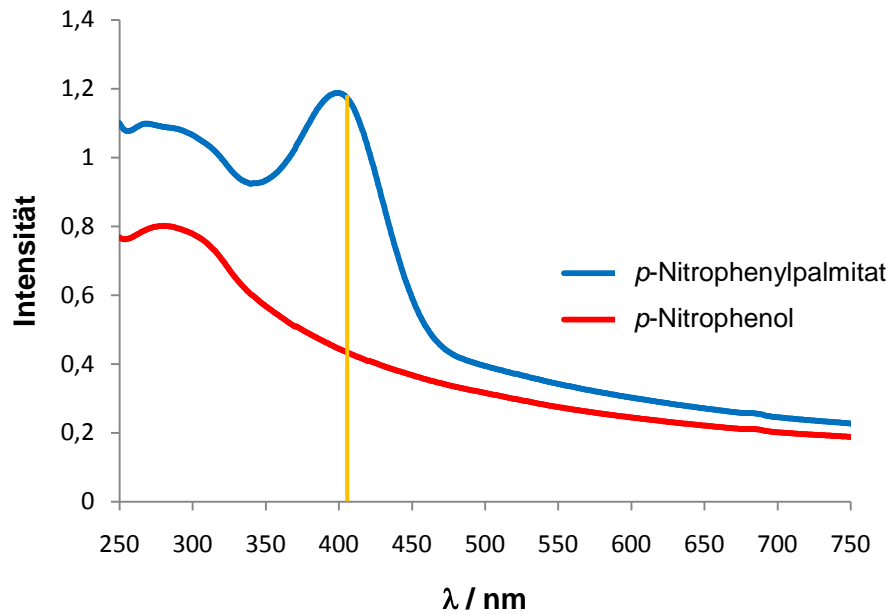


Abb. 3.58: UV-Übersichtsspektrum von *p*-Nitrophenylpalmitat (rot) und von freiem *p*-Nitrophenol (blau).

Die Oberfläche der Pankreaslipase trägt eine große Zahl negativ geladener Aminosäuren. Es ist daher zu erwarten, dass BP-haltige Polymere die Aktivität dieses Enzyms nicht einschränken. Jedoch können schwache inhibitorische Eigenschaften der Polymere **8**, **15** und **33** beobachtet werden, aber eine vollständige Inhibierung ist selbst nach zweistündiger Inkubationszeit und großen Überschüssen der Polymere nicht möglich.

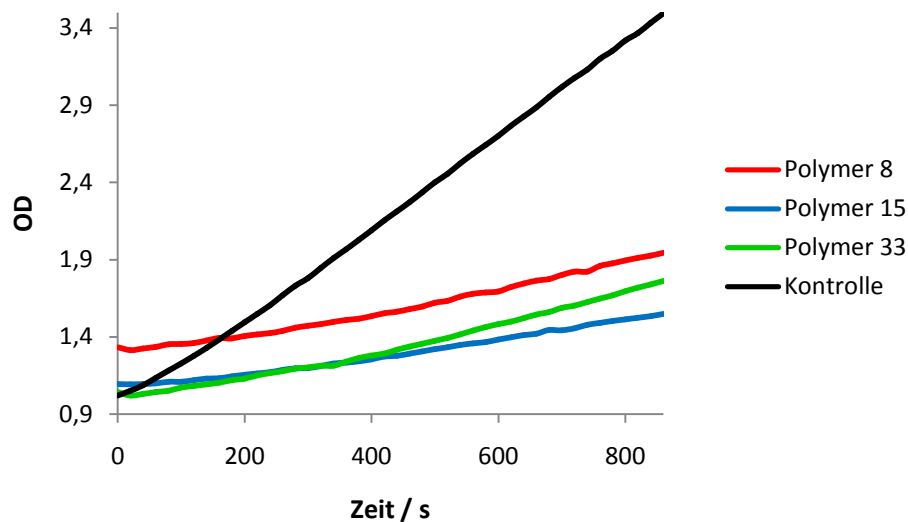


Abb. 3.59: Screening der Polymere **8**, **15** und **33** mit Pankreaslipase.

CBS-haltige Polymere sollten einen starken Einfluss auf die Aktivität der Pankreaslipase zeigen. Tatsächlich wird die Pankreaslipase im Screening nur von einem Polymer vollständig inhibiert, dem Polymer **31**, das aus einem Äquivalent CBS- und zehn Äquivalenten Glucose-Monomer besteht. Polymer **32**, das neben dem CBS-Monomer 20 Äquivalente Glucose-Monomer enthält, kann die Lipase nicht vollständig inhibieren. Die Polymere, die neben dem CBS-Monomer zusätzlich Ammonium-Monomer enthalten, zeigen auch in Kombination mit anderen Monomeren keine Effekte.

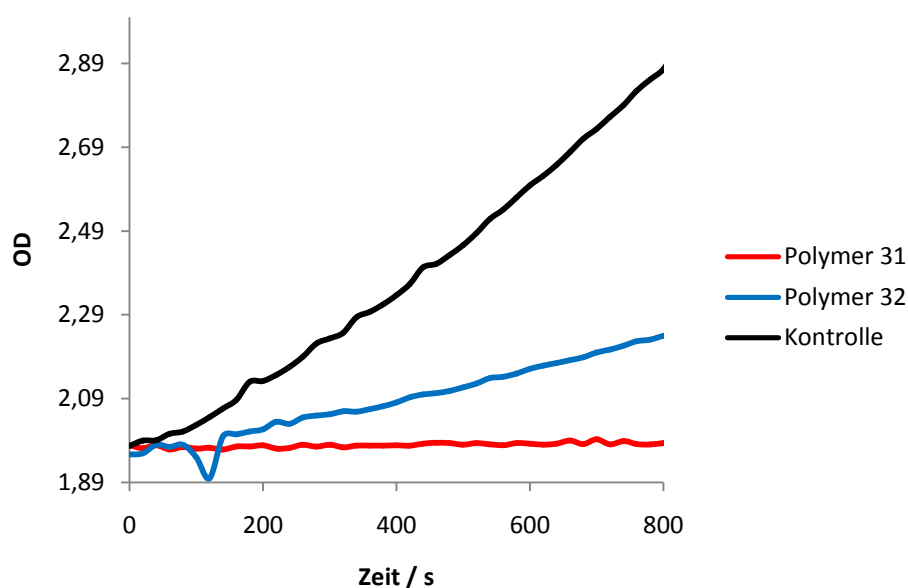


Abb. 3.60: Screening der Polymere **31** und **32** mit Pankreaslipase.

Die Polymere **8**, **15**, **31**, **32** und **33** wurden in Verdünnungsreihen zwischen 20 mg/mL und 20 µg/mL mit Lipase getestet. Das Polymer **31** war das einzige Polymer, mit dem ein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Der IC_{50} -Wert liegt mit 2.37 µM bei ca. fünffacher Enzymkonzentration. Mit den anderen Polymeren konnten keine vollständigen Inhibierungen erzielt werden.

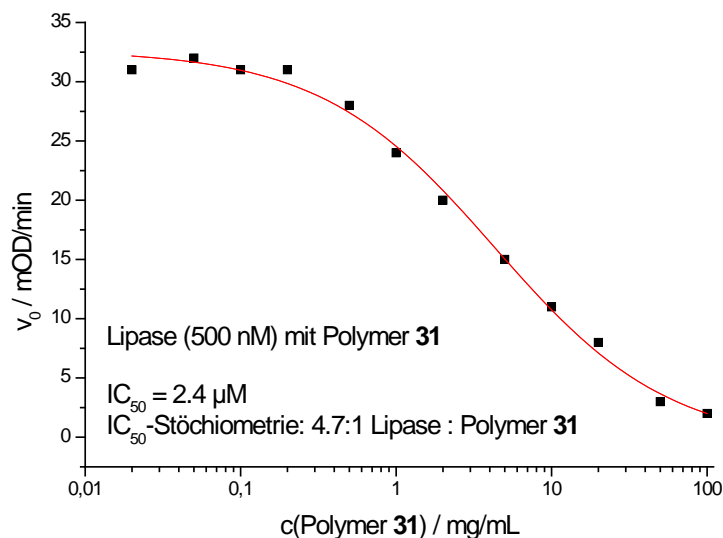
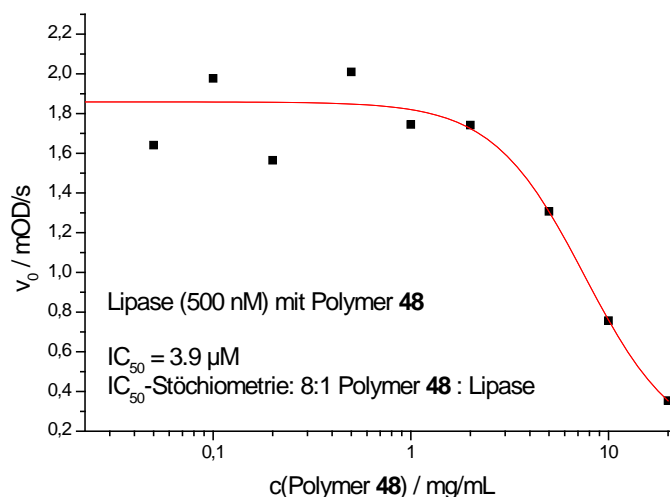


Abb. 3.61: IC_{50} -Kurve: Lipase mit Polymer **31**.

Mit zehn Äquivalenten Zucker- und nur einem Äquivalent CBS-Monomer ist der Anteil an spezifisch bindenden Resten im Polymer **31** sehr gering. Im Vergleich dazu ist der Anteil im Polymer **32** noch geringer und vermutlich zu gering, um eine effektive und starke Bindung zu erreichen.

In die Polymere **8**, **15**, **31**, **32** und **33** wurde je ein Äquivalent des substratmimetischen Stearinsäure-Monomers einpolymerisiert.

Trotz Zugabe des substratmimetischen Monomers konnte keine Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften der Polymere festgestellt werden. Die einzige vollständige Inhibierung erfolgt durch das Polymer **48**, das dem Polymer **31** mit einem zusätzlichen Äquivalent Stearinsäure-Monomer entspricht. Der IC_{50} -Wert liegt mit $3.9 \mu M$ höher als der IC_{50} -Wert mit Polymer **31** ohne Substratmimetikum.

Abb. 3.62: IC₅₀-Kurve: Lipase mit Polymer **48**.

Die Struktur des aktiven Zentrums der Pankreaslipase zeigt, warum das substratmimetische Monomer keine Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften bewirkt: Das aktive Zentrum wird durch ein Lid verschlossen. Allein durch Aktivierung wird es geöffnet und gewährt dem Substrat den Zugang. Eine Aktivierung erfolgt bei der Zugabe der Polymere nicht, das aktive Zentrum bleibt damit geschlossen und kann den substratmimetischen Rest der Polymere nicht binden.

Die IC₅₀-Werte mit den Polymeren **31** und **48** sind nahezu identisch, der Kurvenverlauf ist mit Substratmimetikum aber deutlich steiler. Die vollständige Inhibierung der Pankreaslipase erfolgt mit 41 µM Polymer **31**, mit Polymer **48** ist schon ¼ der Konzentration ausreichend.

Die Selektivität dieser beiden Inhibitoren ist sehr hoch. Eine Aktivitätsbeeinflussung mit den anderen getesteten Enzymen ist nicht zu beobachten.

Tab. 3.6: Inhibitoren der Pankreaslipase.

Polymer	Zusammensetzung	IC ₅₀ / µM	Verhältnis Polymer : CatD
31	7 / 2 (1:10)	2.4	5:1
48	7 / 2 / 11 (1:10:1)	3.9	8:1

3.3.7. Thrombin

Thrombin spielt bei der Blutgerinnung eine entscheidende Rolle, weil es sowohl die Fibrinopeptide A und B aus Fibrinogen freisetzt als auch den Faktor XIIIa aktiviert, der die Quervernetzung der Fibrinopeptide katalysiert. Dieses unlösliche Fibringerinnsel bewirkt den Wundverschluss ^[148].

Thrombin wird als inaktives Vorläuferprotein Prothrombin in der Leber synthetisiert und ins Blut ausgeschüttet. In seine aktive Form wird Thrombin im Prothrombinase-Komplex ^[149] überführt, in dem auf der Oberfläche der Thrombozyten die Faktoren Va und Xa sowie Ca^{2+} -Ionen ^[150] zusammentreten. Reguliert wird die Thrombin-Konzentration über einen strengen Rückkopplungsmechanismus. Seine Aktivität wird zudem über die Thrombin-Inhibitoren Antithrombin III ^[151], α 2-Makroglobulin ^[152] und Heparin-Cofaktor II ^[153] limitiert.

Das aktive Thrombin entsteht durch proteolytische Spaltung des 582 Aminosäuren langen Prothrombins in eine 36 Aminosäuren lange (ca. 6 kDa) und eine 259 Aminosäuren lange (ca. 31 kDa) Polypeptidkette, die über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind.

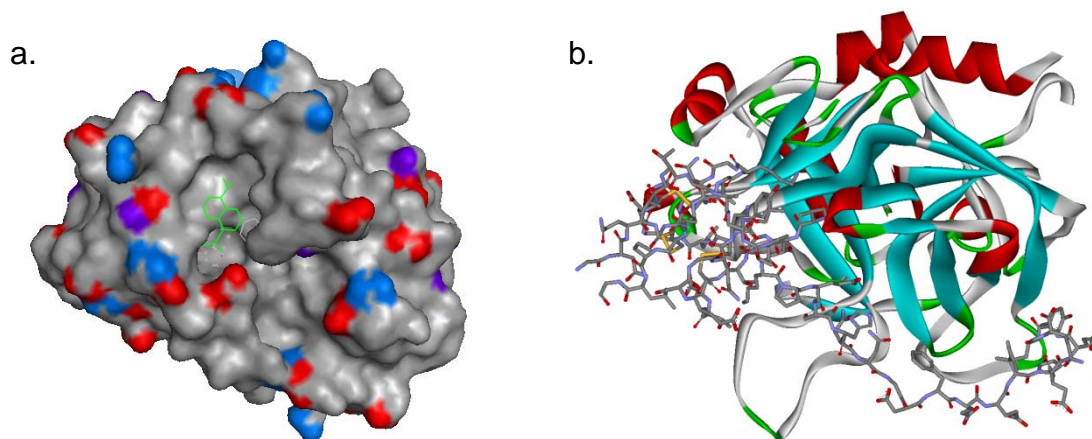


Abb. 3.63: Struktur von Thrombin **a.** Oberfläche (rot: Asp, Glut; blau: Arg; violett: Lys) (pdb: 2zhe), **b.** Sekundärstrukturelemente des Thrombins im Komplex mit Hirudin (pdb: 4htc).

Das pH-Optimum liegt bei 8 ^[154], der isoelektrische Punkt beträgt 7.1. ^[155]

Thrombin ist wie die meisten Verdauungsenzyme eine Serin-Protease und besitzt eine ähnliche Sekundär- und Tertiärstruktur wie Trypsin. Aus der deutlich unterschiedlichen Aminosäuresequenz resultieren Unterschiede auf der Oberfläche und in der Bindungstasche. Auf diese Weise wird die Spezifität der Enzyme gewährleistet. Das aktive Zentrum des Thrombins liegt versteckt und schwer zugänglich für Substrate. Durch die höhere Spezifität kann der Selbstverdau im Blut verhindert werden.

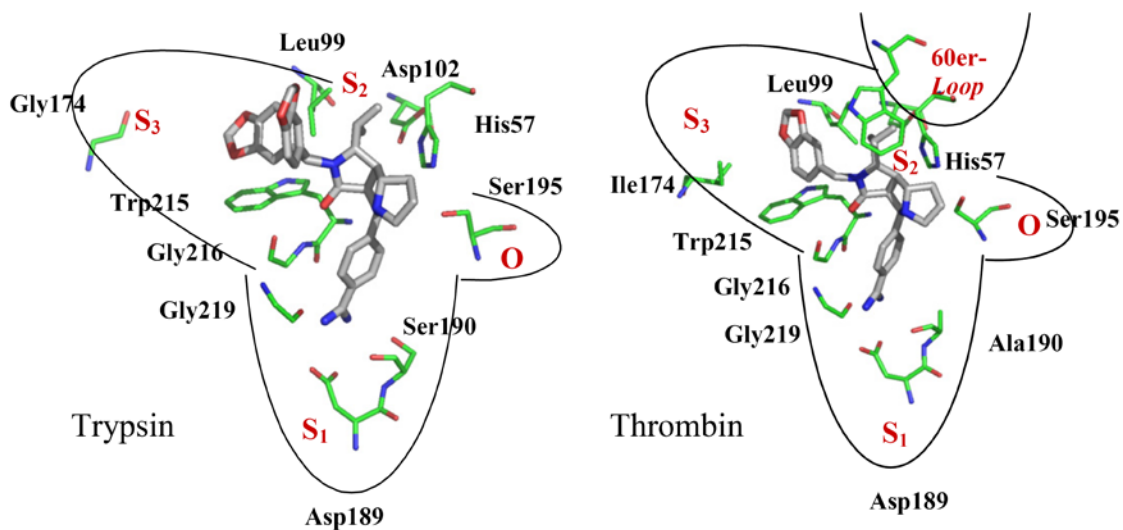


Abb. 3.64: Vergleich der aktiven Zentren: Die Substratbindungstasche des Trypsins ist relativ frei, die des Thrombins durch den 60er-Loop viel schwerer zugänglich. ^[148]

Ähnlich wie Trypsin spaltet Thrombin peptidische Substrate C-terminal von Arginin. Die Bestimmung der Thrombin-Aktivität beruht auf der Spaltung eines peptidischen, argininhaltigen, farbstoffmarkierten Substrats. ^[11]

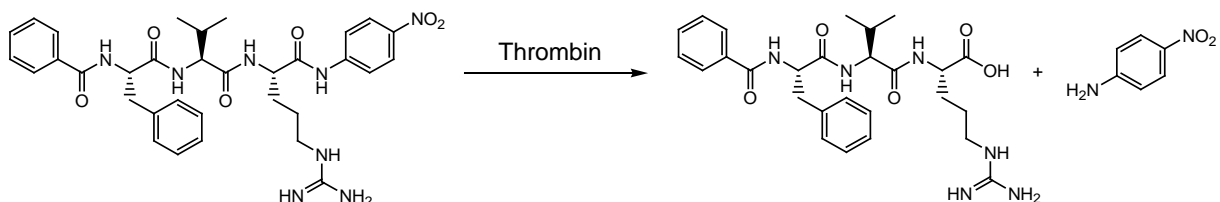


Abb. 3.65: Spaltung von *N*-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilin durch Thrombin.

Durch die Spaltung des peptidischen Substrats hinter Arginin wird *p*-Nitroanilin freigesetzt. Die Zunahme kann bei 405 nm detektiert werden.

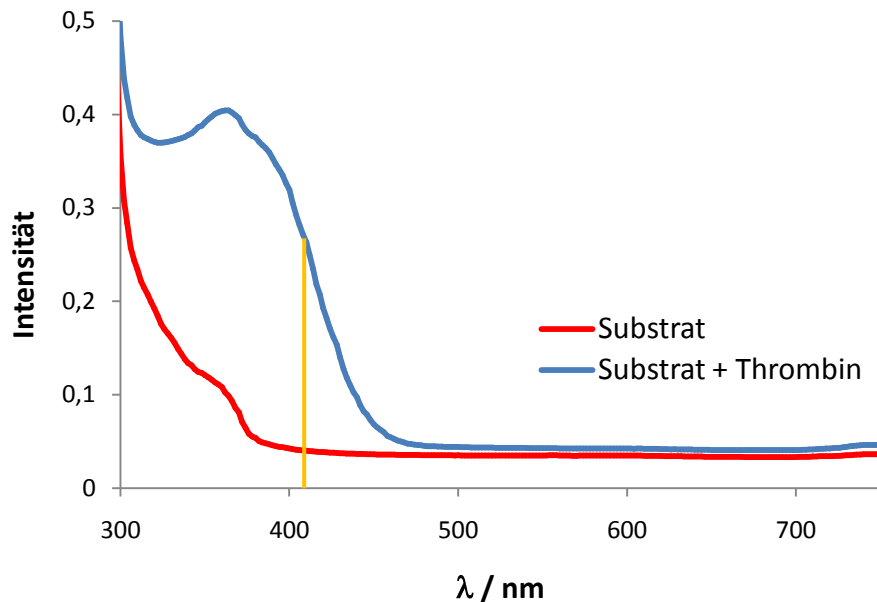


Abb. 3.66: UV-Übersichtsspektrum von *N*-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilin (rot) und vom freien *p*-Nitroanilin (blau).

Wird bei der Behandlung einer akuten Pankreatitis eine Inhibierung der Verdauungsenzyme angestrebt, muss die Inhibierung der „falschen“ Enzyme ausgeschlossen werden: Die Inhibierung des Thrombins verhindert die Blutgerinnung und kann zu inneren Blutungen führen.

Polymere, die andere Verdauungsenzyme hemmen, dürfen Thrombin nicht inhibieren. Aufgrund des neutralen pI-Wertes kann vermutet werden, dass sowohl BP-haltige als auch CBS-haltige Polymere die Thrombinaktivität beeinflussen können. Es konnte jedoch keine Aktivitätseinschränkung festgestellt werden.

Der stärkste natürliche Inhibitor des Thrombins ist Hirudin, ein Polypeptid, das antikoagulatorische Eigenschaften besitzt. Es besteht aus 65 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 7 kDa. Die Inhibierung erfolgt durch Bindung des Hirudins auf der Oberfläche des Thrombins, so dass mehr als 20 % der Enzymoberfläche bedeckt sind (vgl. Abb. 3.63.b). ^[69, 156]

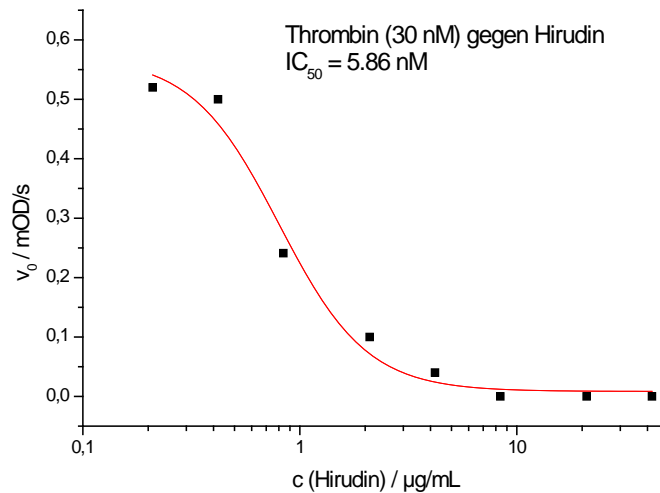


Abb. 3.67: IC₅₀-Kurve von Thrombin mit Hirudin.

Bei der Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde eine Konzentration von 5.86 nM gefunden. Eine vollständige Inhibierung des Thrombins wird bei äquimolaren Mengen an Enzym und Inhibitor beobachtet. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein, die einen 1:1-Komplex zeigen konnte. ^[157]

Somit kann ausgeschlossen werden, dass wegen eines fehlerhaften Enzymassays eine Inhibierung durch die Polymere nicht detektiert wird.

3.3.8. Diskussion

Die Tabelle 3.7 fasst die oben dargestellten Ergebnisse zusammen. Die in schwarz dargestellten IC₅₀-Werte wurden mit den in der ersten Spalte aufgeführten Polymeren bestimmt. Wurden IC₅₀-Werte mit Polymeren bestimmt, die ein oder mehrere Äquivalente an substratmimetischen Monomeren enthalten, wurden die Ergebnisse farbig markiert.

Tab. 3.7: Übersicht über die gemessenen IC_{50} -Werte. Es wurden folgende Farben verwendet: schwarz (Polymer, das in Spalte 1 dargestellt ist), blau (Polymer mit 1 eq Phe-Monomer), rot (Polymer mit 3 eq Phe-Monomer), grün (Polymer mit 1 eq Lys-Monomer), violett (Polymer mit 3 eq Lys-Monomer), orange (Polymer mit 1 eq Stearinsäure-Monomer).

	Chymotrypsin (7.95 μ M)	Trypsin (3.9 μ M)	Cathepsin D (2.54 nM)	Lipase (500 nM)	Thrombin (30 nM)
Polymer 1	- *	-	61 nM	-	-
5 BP, 1 Zucker, 2 Dansyl	-	-	308 nM	-	-
	-	-	109 nM	-	-
Polymer 2	-	-	64 nM	-	-
5 BP, 3 NTA, 1 Zucker	-	589 nM	55 nM	-	-
	-	-	41 nM	-	-
Polymer 3	-	2.0 μM	68 nM	-	-
5 BP 1 Dodecyl, 1 Zucker	-	-	135 nM	-	-
	-	780 nM	111 nM	-	-
	-	-	-	-	-
Polymer 5	-	-	-	-	-
3 BP, 1 CD, 1 Zucker, 0.5 Dansyl	-	-	232 nM	-	-
Polymer 7	-	-	95 nM	-	-
3 BP, 1 NTA, 1 Zucker, 0.5 Dansyl	-	-	124 nM	-	-
	-	-	81 nM	-	-
Polymer 33	-	-	-	-	-
1 BP, 1 CD, 1 Zucker	-	-	603 nM	-	-
	-	-	-	-	-
Polymer 31	-	-	-	2.4 μM	-
1 CBS, 10 Zucker	-	-	-	3.9 μM	-

* - \equiv >100 μ M

Chymotrypsin kann von keinem der hergestellten Polymere inhibiert werden. Trotz der vielen basischen Aminosäuren auf der Oberfläche bewirken selbst Polymere mit einem hohen BP-Anteil (5 eq) keine Aktivitätseinschränkung. Auch Polymere, die das Phe-Monomer enthalten und somit als Substratmimetikum wirken, zeigen keine Effekte.

Lediglich das Polymer **3** zeigte einen starken inhibitorischen Effekt auf **Trypsin**, aber auch CatD kann von diesem Polymer inhibiert werden. Der Versuch einer Verbesserung der Spezifität und der Inhibierungsstärke der Polymere durch

substratmimetische Monomere schlug fehl. Eine Komplexierung der Ammonium-Ionen des Lysin-Monomers **13** durch die BP-Reste könnte als Erklärung dienen. Diese ist zwar deutlich schwächer als die Komplexierung von Guanidinium-Ionen, dennoch ist eine Anordnung der Polymerkette denkbar, in der die Chelatisierung der Ammonium-Ionen der Lysin-Seitenketten eintritt. Die Zahl freier BP-Pinzetten in dem Polymer wäre geringer als in den zu verbessernden Polymeren, und die Inhibitoreigenschaften wären schlechter. In Polymer **33**, das nur ein Äquivalent BP enthält, könnten sogar alle BP-Pinzetten durch Ammonium-Ionen blockiert sein. Mit diesem Polymer kann keine Beeinträchtigung der Trypsin-Aktivität beobachtet werden. Das Phe-Monomer zeigt hingegen einen beträchtlichen Einfluss auf die Trypsin-Aktivität. Die Bindung erfolgt vermutlich an der Oberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums, wo einige aromatische Aminosäuren lokalisiert sind. Die Inhibierung kann im Vergleich zu den Polymeren ohne Phe-Reste bis zu vierfach verstärkt werden.

Cathepsin D kann durch mehrere Polymere mit einem hohen BP-Anteil inhibiert werden. Die Kombination mit unpolaren Monomeren zeigt gute Effekte. Auch in Kombination mit dem NTA-Monomer können einige inhibierende Polymere gefunden werden. Zur Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften wurde als substratmimetisches Monomer ein Phenylalanin-Monomer verwendet. Die Kombination des Phe-Monomers **14** mit den Polymeren **1** und **3**, die unpolare Monomere enthalten, verschlechtert die Inhibitoreigenschaft. In Polymer **1** könnten π -Stapel-Wechselwirkungen zwischen dem Phe-Rest und dem Dansyl-Rest auftreten. Auch zur BP-Pinzette ist eine solche Wechselwirkung denkbar. Mit den NTA-haltigen Polymeren **2** und **7** können ähnliche IC_{50} -Werte mit und ohne Phe-Monomer beobachtet werden. Drei Äquivalente des Substratmimetikums verbessern die Inhibitoreigenschaften im Vergleich zu Polymeren mit einem Äquivalent des Phe-Monomers in allen Fällen. Die Polymere **2** und **7** mit jeweils drei Äquivalenten Phe-Monomer können die IC_{50} -Werte verringern und man erhält mit dem Polymer **53** den besten Inhibitor. Der Vergleich zwischen den Polymeren **5** und **7** zeigt den Einfluss des NTA- und des CD-Monomers: Polymer **7** mit seinen NTA-Resten zeigt mit 95 nM eine starke Inhibierung von CatD, Polymer **5** mit seinen CD-Resten kann die katalytische Aktivität des CatD nicht hemmen.

Das einzige die **Lipase** inhibierende Polymer enthält das CBS-Monomer als selektiven Rezeptor. Der IC_{50} -Wert liegt bei einem Verhältnis von 5:1 zwischen Polymer **31** und Lipase bei 2.4 μM . Die Aktivität der anderen Enzyme wird durch das Polymer **31** nicht eingeschränkt, es handelt sich somit um einen selektiven Lipase-Inhibitor. Eine Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften kann durch den Einbau eines substratmimetischen Stearinsäure-Monomers nicht nachgewiesen werden, die IC_{50} -Werte sind nahezu identisch. Allerdings kann die zur vollständigen Inhibierung der Lipase benötigte Polymer-Menge auf ein Viertel reduziert werden: Werden noch 41.2 μM Polymer **31** benötigt, genügen 10.3 μM Polymer **48**.

Aufgrund der blutgerinnenden Wirkung von **Thrombin** muss eine Hemmung dieses Enzyms ausgeschlossen werden. Auf der Oberfläche des Thrombins sind saure und basische Aminosäuren etwa in gleicher Anzahl vorhanden, es kann jedoch weder mit CBS- noch mit BP-haltigen Polymeren eine Verringerung der Thrombin-Aktivität beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch den Einbau substratmimetischer Monomere in inhibierende Polymere keine Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften der Polymere zu beobachten ist. Gründe können in der Komplexierung der Monomere untereinander liegen. Auch eine unzureichende Bindungsmöglichkeit im aktiven Zentrum kann nicht ausgeschlossen werden. Die Verknüpfung der Substratmimetika über einen Spacer mit der Polymerkette könnte dieses Problem beheben. Es wäre ebenfalls denkbar, dass die C-terminalen Schutzgruppen im aktiven Zentrum abgespalten werden, und die erzeugten Carboxylate aus dem aktiven Zentrum analog zur Peptidspaltung der natürlichen Substrate entlassen werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue spezifische Haftmonomere entwickelt und synthetisiert, eine neue Polymerisationstechnik hat den Zugang zu kleinen Polymer-Bibliotheken eröffnet und ein Screeningverfahren erlaubte es, diese Bibliothek gegen diverse Verdauungsenzyme zu testen.

Zur Bindung bisher nicht erkannter Aminosäure-Klassen wurden bekannte Bindungsmotive für saure und aromatische Aminosäuren sowie für Histidin übernommen und als polymerisierbare Monomere hergestellt. Zusätzlich wurden substratmimetische Monomere zur Bindung in der Substratbindungstasche der Enzyme hergestellt.

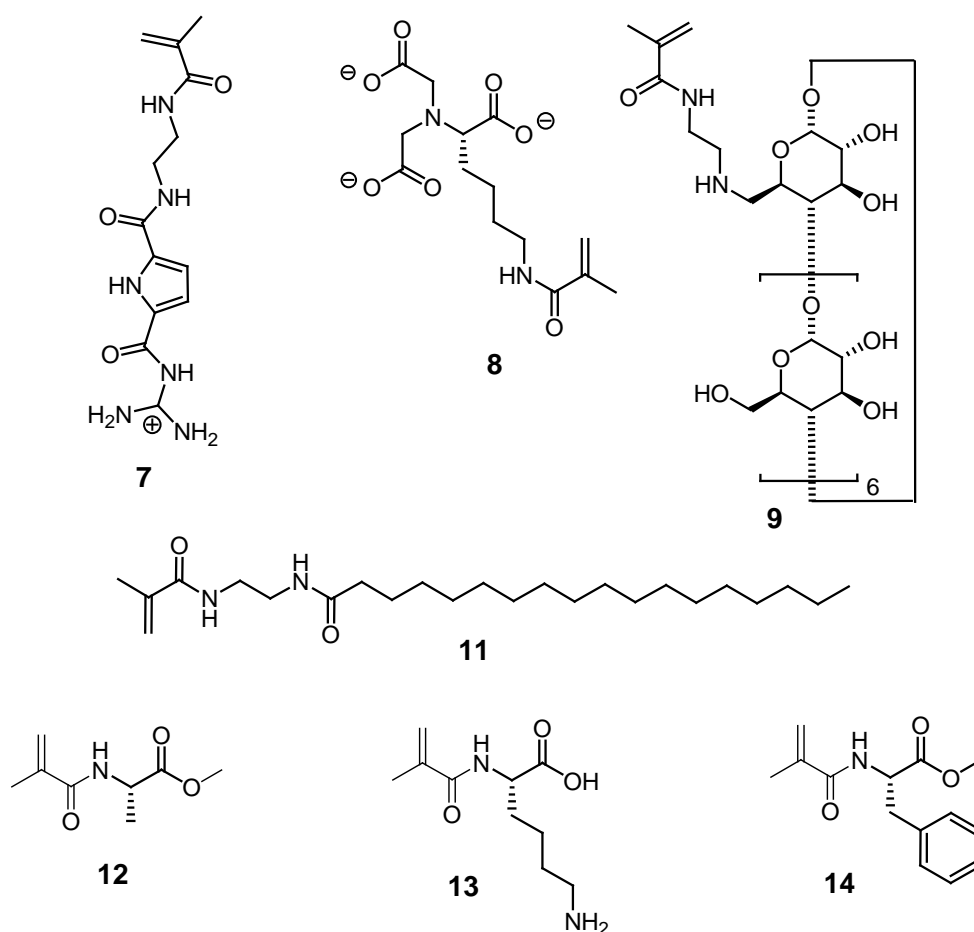


Abb. 4.1: Synthetisierte Monomere.

Die Rezeptoren für die sauren Aminosäuren Aspartat / Glutamat und Histidin sowie die aromatischen Aminosäuren waren bereits literaturbekannt und wurden durch die Verknüpfung mit einem Methacrylsäurerest polymerisierbar gemacht.

Die substratmimetischen Monomere aus Alanin, Lysin und Phenylalanin wurden durch *N*-terminale Kupplung mit Methacrylsäurechlorid dargestellt, das Stearinsäure-Monomer **11** durch Kupplung von Stearinsäurechlorid mit dem Ammonium-Monomer **10**.

Eine neue Polymerisationstechnik wurde entwickelt, die den Anforderungen zur Herstellung einer kleinen Polymer-Bibliothek gerecht wurde.

Die Polymerisationen konnten in kleinem Maßstab mit 30 – 50 mg Monomergesamtmenge durchgeführt werden, was nur noch 1/10 der in den Vorarbeiten benötigten Mengen entspricht. In 1 mL - Glasgefäßen konnten bis zu 24 Polymerisationen parallel zueinander im Thermomixer durchgeführt werden. Die Reaktionsgemische wurden nach siebentägiger Reaktionszeit bei 60°C ohne weitere Aufarbeitung getrocknet.

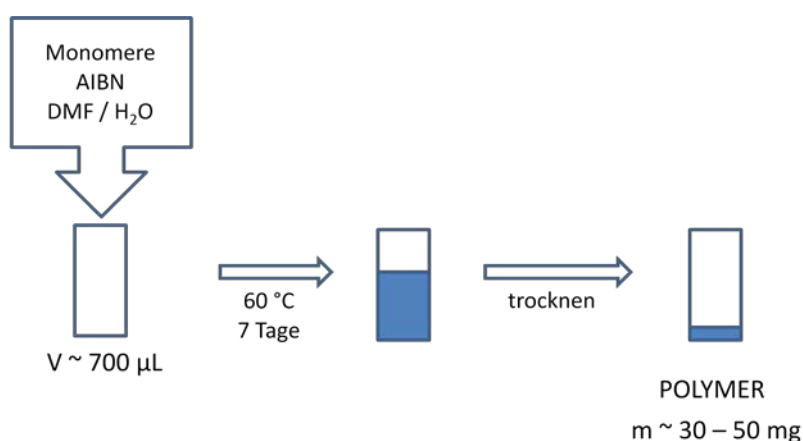


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Polymerisation.

Die Ausbeuten waren quantitativ. NMR-spektroskopische Analysen zeigten, dass maximal 10 % Monomerrückstände in den Polymerproben vorlagen, GPC-Analysen ließen auf Molekulargewichte zwischen 50 und 200 kDa schließen. Löslichkeitsprobleme traten bei CBS-haltigen Polymeren auf; die Zugabe von zehn und mehr Äquivalenten des Glucose-Monomers **2** oder ein bis drei Äquivalenten des Ammonium-Monomers **10** erhöhten die Wasserlöslichkeit und ließen Analysen und den Einsatz in enzymatischen Untersuchungen zu.

Die Polymere wurden mit fünf Verdauungsenzymen (Chymotrypsin, Trypsin, Cathepsin D, Pankreaslipase und Thrombin) in einem Screeningverfahren untersucht. Sie wurden etwa in 20fachem Überschuss zu den zu untersuchenden Enzymen zugegeben.

Das Chymotrypsin konnte durch keines der hergestellten Polymere inhibiert werden.

Trypsin wird stark von Polymer **3** inhibiert, das mit fünf Äquivalenten BP die vielen positiven Aminosäuren auf der Oberfläche binden kann. Auch Polymere mit hohem BP- und Phe-Anteil zeigen inhibitorische Effekte auf das Trypsin. Die Inhibierungen erfolgen mit substöchiometrischen Mengen der Polymere.

Viele BP-haltige Polymere können die Enzymaktivität von Cathepsin D hemmen. Einige dieser Polymere sind hochselektiv und inhibieren ausschließlich CatD, aber auch die Trypsin-Inhibitoren sind Hemmer des CatD. Die IC_{50} -Werte liegen mit CatD zwar deutlich niedriger als mit Trypsin, eine Inhibierung in substöchiometrischen Konzentrationen erfolgt jedoch nicht.

Die Pankreaslipase konnte als saures Enzym von einem CBS-haltigen Polymer mit ähnlichen IC_{50} -Werten mit und ohne Substratmimetikum inhibiert werden. Diese Polymere sind hochspezifisch gegenüber den sonstigen getesteten Enzymen.

Zur Kontrolle wurde das Thrombin als Blutgerinnungsfaktor untersucht. Es konnten keine inhibitorischen Effekte der Polymere auf das Thrombin beobachtet werden.

Der Einbau substratmimetischer Monomere zeigte nicht die gewünschten Verbesserungen in der Inhibitorleistung der Polymere. Zwar traten vereinzelt leichte Verbesserungen der IC_{50} -Werte auf, in den meisten Fällen blieben die Substratmimetika jedoch wirkungslos oder verschlechterten die inhibitorischen Effekte.

4.2. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hochspezifische Polymere als Inhibitoren für Verdauungsenzyme des Pankreas gefunden. Zur zukünftigen Untersuchung *in vitro* und *in vivo* ist es jedoch unabdingbar, genauere Informationen über die Wirkungsweise und den Mechanismus der Hemmung zu sammeln.

Nachstehende weiterführende Experimente werden in diesem Zusammenhang vorgeschlagen: ^[38]

Mit fluoreszenzmarkierten Polymeren können Bindungskonstanten zu den Enzymen ermittelt werden.

Der Inhibierungstyp (kompetitiv, nicht kompetitiv oder eine gemischte Form) kann durch Variation der Substratkonzentrationen herausgefunden werden.

Mit Hilfe von CD-spektroskopischen Untersuchungen kann eine Hemmung durch Denaturierung der Enzyme nachgewiesen werden.

SDS-Gelelektrophorese kann zeigen, ob die Enzym-Polymer-Komplexe in Lösung vorliegen oder ob die Hemmung durch Ausfällen der Komplexe auftritt.

Schließlich kann durch Zugabe eines stärkeren Polymerbinders, z.B. Polyarginin bei BP-haltigen Polymeren oder Polyaspartat bei CBS-haltigen Polymeren, die Reversibilität der Enzymhemmung untersucht werden.

Die Wirkungsweise der Polymere an kultivierten Zellen, isolierten Organen und *in vivo* an Tiermodellen kann in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *de Groot* getestet werden.

Der Ansatz, substratmimetische Monomere zur Verbesserung der Selektivität und der inhibitorischen Eigenschaften einzupolymerisieren, könnte durch Veränderung der Monomerstruktur verbessert werden:

Durch einen Spacer zwischen Polymerrückgrat und Aminosäureseitenkette könnte der Eintritt ins aktive Zentrum erleichtert werden.

Der C-Terminus der Aminosäuren muss geschützt sein, da eine freie Säurefunktion hinter der zu erkennenden Aminosäure einen Austritt aus dem aktiven Zentrum auslöst oder ein Eintritt nicht möglich ist. Ob die Methylester-Schutzgruppe im aktiven Zentrum ebenfalls gespalten werden kann, bleibt unklar. Da Enzymassays in

der Literatur beschrieben sind, in denen C-terminale Esterfunktionen gespalten werden können, ist diese Möglichkeit ebenfalls in Betracht zu ziehen.^[158] Alternativ zur polymerisierbaren Aminosäuren sind Monomere tauglich, in denen lediglich die Aminosäureseitenkette über einen Spacer mit der Methacrylsäure verknüpft ist.

Auch die Herstellung von Monomeren, die literaturbekannten Inhibitoren ähneln, kann erwogen werden. So ist ein Benzamidin-Monomer bereits erfolgreich als Inhibitor für Trypsin in molekular geprägten Mikrogelen verwendet worden.^[159]

Die Synthese neuer Monomere wird in der Arbeitsgruppe *Schrader* bereits im Rahmen einer Diplomarbeit von *Gilles* bearbeitet:

Das wirkungslose Cyclohexylmonomer könnte mit einem Spacer zwischen dem Cyclohexylring und dem Polymerrückgrat stärkere Effekte zeigen. Ein wasserlösliches fluoreszierendes Monomer sollte die Wasserlöslichkeit fluoreszenzmarkierter Polymere verbessern. Ein Benzamidin-Monomer kann als Inhibitor für Trypsin wirken.

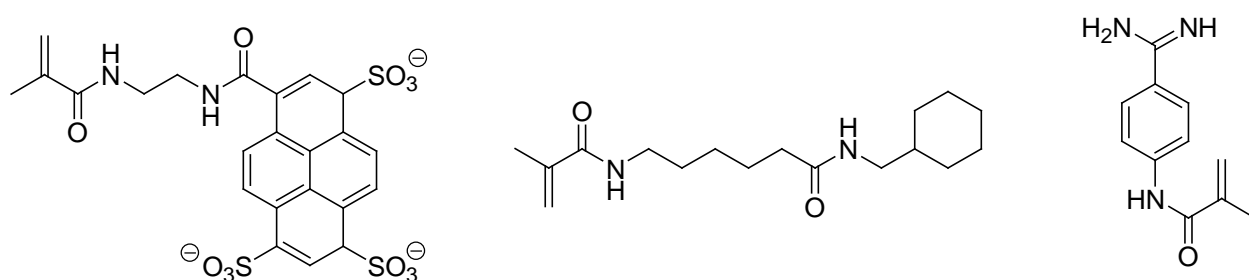


Abb. 4.3: Monomere hergestellt in Rahmen der Diplomarbeit von *Gilles*.

Der Aufbau neuer Assays von Enzymen des Verdauungssystems, z.B. der Amylase, Elastase, von Pepsin und Kallikrein, kann weitere Anhaltspunkte bezüglich der Selektivität der Inhibitoren liefern.

Ein alternativer Weg zur Entwicklung selektiver Inhibitoren ist die Synthese von molekular geprägten Polymeren (MIPs), die die aminosäurespezifischen Monomere enthalten. Erste Versuche wurden hierzu bereits in der Arbeit von *Sun* in Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Sellergren* geleistet^[37] und werden von *Latza* weiterverfolgt.

5. Experimenteller Teil

5.1. Materialien

Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen *Acros Organics*, *Sigma-Aldrich*, *Bachem*, *Fluka*, *Merck* und *Nova Biochem* bezogen und, falls nicht anders angegeben, in den erhaltenen Qualitäten eingesetzt.

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel technischer Qualität wurden vor Gebrauch destillativ gereinigt und bei Bedarf nach Standardmethoden absolutiert.^[160]

Das benutzte Wasser wurde über eine *ELGA* Purelab UHQ-Anlage entionisiert.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für dünnsschichtchromatographische Analysen wurden *Alugram SIL G/UV₂₅₄* Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma *Roth* verwendet. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 354 nm und 366 nm oder durch Anfärben mit Ninhydrin-Reagenz (0.3 g Ninhydrin, 3 mL Eisessig, 100 mL Ethanol)^[160].

Säulenchromatographie

Als stationäres Säulenmaterial diente Kieselgel 60 (230 – 400 mesh ASTM) der Firma *Merck*. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Pressluftüberdrucks. Die Laufmittelgemische sind jeweils im Volumenverhältnis mit dem substanzspezifischen R_f -Wert angegeben.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der Gelpermeationschromatographie kam neben einer Pumpe *Jasco* PU-980 ein RI-Detektor *Jasco* RI-930 zum Einsatz. Als Säulen wurden zwei HEMA-Bio-Linear 300 x 80 mm verwendet.

NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden, falls nicht anders vermerkt, bei 300 K an den Geräten *Bruker* AMX 300 oder *Bruker* DRX 500 aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenz in MHz sowie das Lösungsmittel angegeben. Die chemischen Verschiebungen δ beziehen sich in ^1H -NMR-Spektren auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels und in ^{13}C -NMR-Spektren auf das ^{13}C -Signal des Lösungsmittels. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden Breitband-entkoppelt gemessen. Die chemische Verschiebung δ wird in parts per million (ppm) vermerkt. Die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgt in Hertz (Hz). Die Signalmultiplizitäten werden mit den Symbolen s (Singulett), sb (breites Singulett), d (Duplett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett), sowie ggf. durch deren Kombination gekennzeichnet.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco* V550 oder einem Mikrotiterplattenreader Infinite M 200 der Firma *Tecan* bei 25°C gemessen.

Die Enzymkinetikassays wurden in einem Mikrotiterplattenreader MRX TC Revelation der Firma *Dynex* oder einem Mikrotiterplattenreader Infinite M 200 der Firma *Tecan* durchgeführt.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Spectrofluorometer FP-6500 der Firma *Jasco* gemessen. Die Temperierung erfolgte mit einem dazugehörigen Pelletier-Element.

Die Enzymkinetikassays mit fluoreszenzaktiven Substraten wurden in einem Tecan Infinite M 200 Mikrotiterplattenreader der Firma *Tecan* durchgeführt.

Massenspektrometrie

Elektro-Spray-Ionisation (ESI) Massenspektren wurden an einem *Bruker* Bio TOF III gemessen. Angegeben sind jeweils die m/z -Werte der wichtigsten Signale. Zusätzlich sind die Summenformel, die berechnete Masse und die gemessene Masse angegeben.

Schmelzpunkte

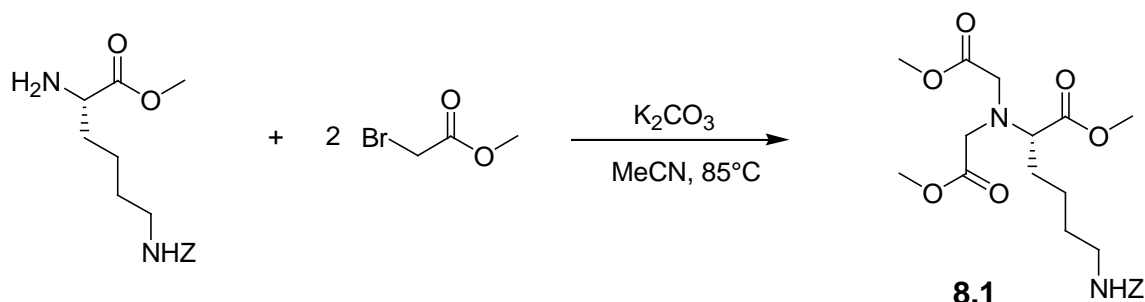
Die Schmelzpunkte wurden mit einer Electrothermal BI-9100-Apparatur der Firma *Bornstead* gemessen.

Gefriertrocknung

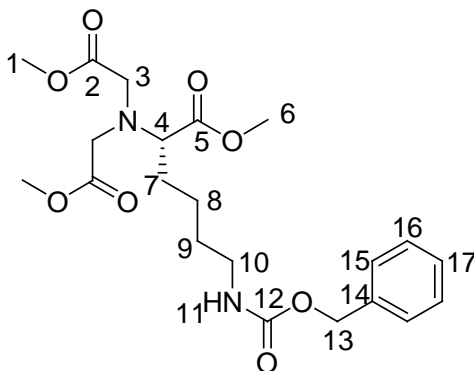
Für die Gefriertrocknung der Polymere und wasserhaltiger Proben wurde die Gefriertrocknungseinheit Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* verwendet.

5.2. Synthese der Monomere

5.2.1. *N*^ε-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester



1 g H-Lys(Z)-OMe (3.4 mmol, 1 eq) wurde in 25 mL Acetonitril suspendiert und mit 3.53 mL Bromessigsäuremethylester (5.68 g, 34 mmol, 10 eq) und 9.4 g Kaliumcarbonat (68 mmol, 20 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei 85 °C erhitzt. Der farblose Feststoff wurde über Kieselgur abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet. Das schwarze, ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch in Cyclohexan / Ethylacetat 2:1 gereinigt. 1.01 g *N*^ε-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (2.3 mmol) wurden als gelbliches Öl isoliert.



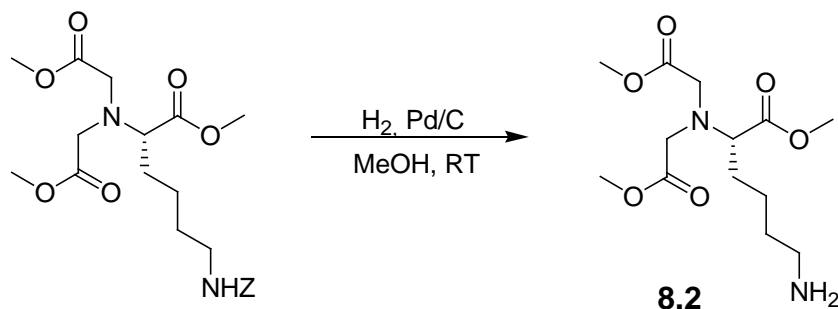
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.30 (m, 1H, H-8), 1.43 (m, 3H, H-8, H-9), 1.59 (m, 2H, H-7), 3.10 (m, 2 H, H-10), 3.33 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1 H, H-4), 3.55 (s, 4 H, H-3), 3.58 (s, 6 H, H-1, H-6), 4.97 (sb, 1 H, H-11), 5.00 (s, 2 H, H-13), 7.21 – 7.17 (m, 5 H, H-14, H-15, H-16).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 23.1 (C-8), 29.5 (C-9), 30.1 (C-7), 40.9 (C-10), 51.6 (C-6), 51.8 (C-1), 52.6 (C-3), 64.7 (C-4), 66.7 (C-13), 128.2 – 128.6 (C-15, C-16, C-17), 136.8 (C-14), 156.7 (C-12), 171.9 (C-2), 173.2 (C-5).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M+H⁺]: m/z = 439.2096 (berechnet für C₂₁H₃₁N₂O₈: 439.2075); [M+Na⁺]: m/z = 461.1914 (berechnet für C₂₁H₃₀N₂NaO₈: 461.1894).

R_f (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) = 0.19.

5.2.2. N^{α} -Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester

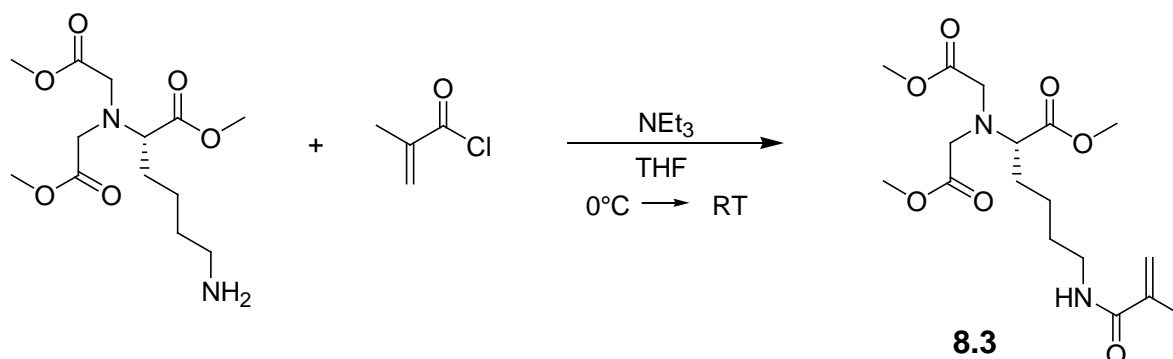


In 10 mL Methanol wurde 1 g N^{ϵ} -Benzyloxycarbonyl- N^{α} -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (2.28 mmol) gelöst, mit katalytischen Mengen Pd / C (10 % Pd) versetzt und unter H_2 -Atmosphäre 3 h gerührt. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet. Es verblieben 690 mg eines farblosen Öls, das ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

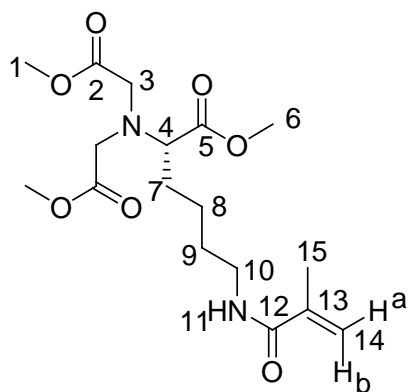
HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[M+H^+]$: m/z = 305.1727 (berechnet für $C_{13}H_{25}N_2O_6$: 305.1707).

R_f (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) = 0 – 0.1.

5.2.3. *N*^ε-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*^α-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysineester



741 mg *N*^α-Bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysineester (2.44 mmol, 1 eq) wurden in 50 ml abs. THF gelöst, mit 680 µL Triethylamin (494 mg, 4.89 mmol, 2 eq) versetzt und 15 min im Eisbad unter Ar-Atmosphäre gerührt. 915 µL Methacrylsäurechlorid (988 mg, 9.45 mmol, 3.9 eq) wurden in 10 mL abs. THF gelöst und langsam zugetropft. Das Gemisch wurde 30 min im Eisbad und 21 h bei RT gerührt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert und mit THF gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch in Cyclohexan / Ethylacetat 1:2 gereinigt. Es verblieben 318 mg *N*^ε-(2-Methyl-1-oxopropenyl)-*N*^α-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysineester (0.85 mmol, 35 %) als farbloses Öl.



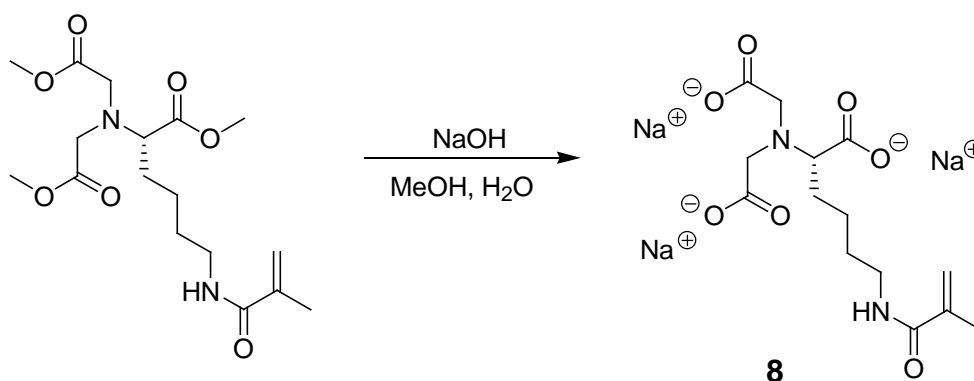
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.43 – 1.59 (m, 4 H, H-7, H-8), 1.69 (m, 2 H, H-9), 1.95 (s, 3 H, H-15), 3.30 (q, ³J_{H,H} = 6 Hz, 2 H, H-10), 3.42 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1 H, H-4), 3.61 (s, 4 H, H-3), 3.67 (s, 9 H, H-1, H-6), 5.29 (s, 1 H, H-14a), 5.68 (s, 1 H, H-14b), 6.08 (sb, 1 H, H-11).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 18.8 (C-15), 39.5 (C-10), 51.6 (C-6), 51.8 (C-1), 52.6 (C-3), 64.5 (C-4), 119.3 (C-15), 140.4 (C-13), 168.9 (C-12), 171.9 (C-2), 173.2 (C-5).

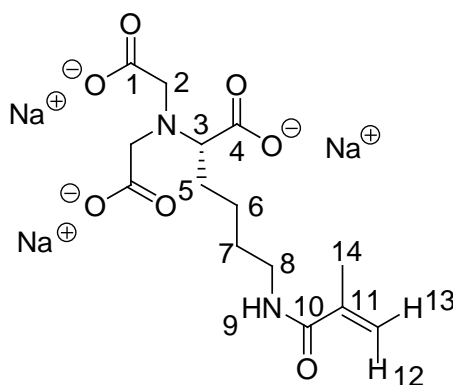
HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[M+H]^+$: $m/z = 373.2004$ (berechnet für $C_{17}H_{29}N_2O_7$: 373.1969); $[M+Na]^+$: $m/z = 395.1818$ (berechnet für $C_{17}H_{28}N_2NaO_7$: 395.1789).

R_f (Cyclohexan / Ethylacetat 1:2) = 0.41.

5.2.4. N^{ϵ} -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- N^{α} -bis(carboxymethyl)-L-lysine



291 mg N^{ϵ} -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- N^{α} -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysine methylester (781 μ mol, 1 eq) wurden in 10 mL Methanol gelöst, mit 1.288 mL NaOH (2 M in H_2O , 3.3 eq) versetzt und 3 Tage bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde getrocknet. Es verblieben 306 mg des N^{ϵ} -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- N^{α} -bis(carboxymethyl)-L-lysine Trinatrium-Salz (781 μ mol, quant.) als farbloser Feststoff.



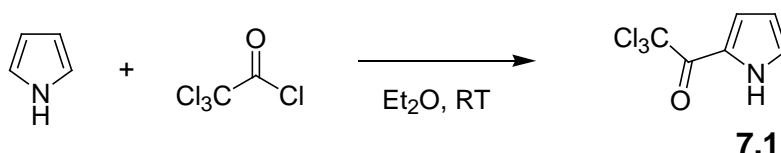
1H -NMR (D_2O , 500 MHz): δ [ppm] = 1.26 (m, 2 H, H-6), 1.52 (m, 4 H, H-5, H-7), 1.86 (s, 3 H, H-14), 3.08 (d, $^2J_{H,H} = 16.8$ Hz, 2 H, H-2), 3.19 (m, 3 H, H-3, H-8), 3.20 (d, $^2J_{H,H} = 16.8$ Hz, 2 H, H-2), 5.37 (s, 1 H, H-13), 5.60 (s, 1 H, H-12).

^{13}C -NMR (D_2O , 125 MHz): δ [ppm] = 15.5 (C-14), 21.3 (C-6), 26.2 (C-5/7), 27.2 (C-5/7), 37.2 (C-8), 54.3 (C-2), 66.1 (C-3), 118.3 (C-12/13), 137.2 (C-9), 169.8 (C-11), 178.0 (C-1), 179.2 (C-4).

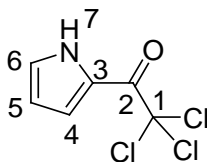
HR-MS (ESI, neg., H_2O): $[\text{M}^{3-}+2\text{H}^+]$: m/z = 329.1344 (calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7$: 329.1354); $[\text{M}^{3-}+\text{H}^++\text{Na}^+]$: m/z = 351.1160 (berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7$: 351.1174); $[\text{M}^{3-}+\text{H}^++\text{K}^+]$: m/z = 367.0826 (berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{KN}_2\text{O}_7$: 367.0913); $[\text{M}^{3-}+\text{H}^++\text{Na}^+]$: m/z = 389.0641 (calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{KN}_2\text{NaO}_7$: 389.0733).

Schmelzpunkt: > 300°C.

5.2.5. Trichloracetylpyrrol



2.47 mL Trichloroacetylchlorid (4 g, 22 mmol, 1.1 eq) wurden in 200 mL Diethylether abs. gelöst. 1.4 mL frisch destilliertes Pyrrol (1.34 g, 20 mmol, 1 eq) wurden über 45 min langsam zugetropft und 1 h bei RT gerührt. Durch tropfenweise Zugabe von 6 mL Kaliumcarbonatlösung (2 M in H_2O , 12.4 mmol, 0.62 eq) wurde die Reaktionslösung neutralisiert. Die Phasen wurden getrennt. Die violette organische Phase wurde 10 min mit einer Spatelspitze Aktivkohle gerührt, über Kieselgur filtriert und getrocknet. 3.13 g Trichloroacetylpyrrol (14.71 mmol, 74 %) wurden als grauer Feststoff erhalten.



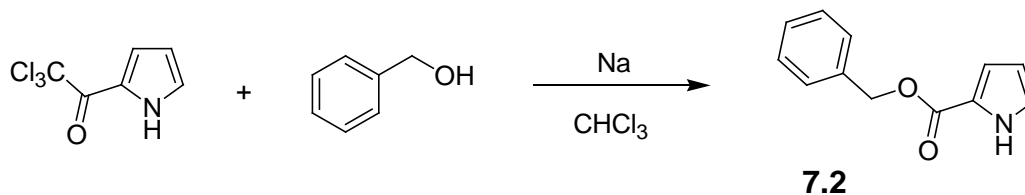
^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 6.39 (m, 1H, H-5), 7.18 (m, 1H, H-4), 7.39 (m, 1H, H-6), 9.58 (sb, 1H, 7).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 95.1 (C-1), 112.0 (C-5), 121.3 (C-4), 123.1 (C-3), 127.2 (C-6), 173.3 (C-2).

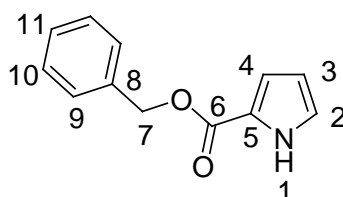
HR-MS (ESI, neg., MeOH): $[M]^-$: $m/z = 209.9287$ (berechnet für $C_6H_3Cl_3NO$: 209.9275).

Schmelzpunkt: 75°C.

5.2.6. 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester



10.97 g Trichloroacetylpyrrol (51.6 mmol, 1 eq) wurden in 15 mL abs. Chloroform gelöst. 240 mg Natrium (10.3 mmol, 0.2 eq) wurden unter Argonatmosphäre in 5.88 mL Benzylalkohol (6.14 g, 56.8 mmol, 1.1 eq) gelöst und zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. 10.3 mL HCl (1 M in H_2O) wurden zugegeben und 10 min bei RT gerührt. Das Chloroform wurde im Vakuum entfernt. Nach Zugabe von 20 mL Wasser wurden das Gemisch getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch in Cyclohexan / Ethylacetat 9:1 gereinigt. Es wurden 8.97 g 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester (44.59 mmol, 86 %) als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.



1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ [ppm] = 5.12 (s, 2 H, H-7), 6.27 (m, 1 H, H-3), 6.97 (m, 2 H, H-2, H-4), 7.39 (m, 5 H, H-9, H-10, H-11), 9.26 (sb, 1 H, H-1).

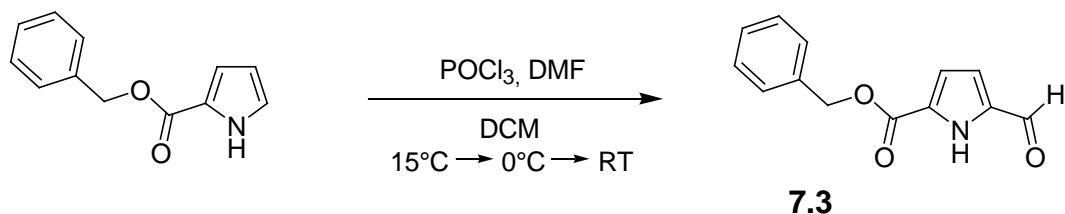
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): δ [ppm] = 66.1 (C-7), 110.9 (C-3), 115.8 (C-4), 122.8 (C-5), 123.1 (C-2), 128.3 – 128.7 (C-9, C-10, C-11), 136.3 (C-8), 161.0 (C-6).

HR-MS (ESI, neg., MeOH): $[M]^-$: $m/z = 200.0731$ (berechnet für $C_{12}H_{10}NO_2$: 200.0706).

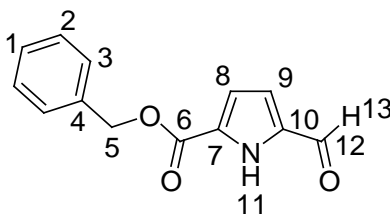
Schmelzpunkt: 55°C

R_f (Cyclohexan / Ethylacetat 9:1) = 0.25.

5.2.7. Formylpyrrolcarbonsäurebenzylester



4.81 mL Phosphorylchlorid (8.06 g, 52.58 mmol, 2 eq) wurden bei 0°C langsam in abs. DMF getropft und 30 min bei 0°C gerührt. 5.29 g 1*H*-Pyrrol-2-carbonsäurebenzylester wurden in 100 mL Dichlormethan gelöst, auf -15°C gekühlt und das Vilsmeier-Reagenz zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 0°C und 20 h bei RT gerührt. 65 mL gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung wurden zugegeben, das Gemisch 15 min unter Rückfluss erhitzt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde zweimal mit je 25 mL gesättigter wässriger NaCl-Lösung, zweimal mit je 25 mL Wasser extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch in Cyclohexan / Ethylacetat / Dichlormethan 70:15:15 gereinigt. Es wurden 3.93 g Formylpyrrolcarbonsäurebenzylester (17.15 mmol, 65 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 5.35 (s, 2 H, H-5), 6.96 (m, 2 H, H-8, H-9), 7.40 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 9.65 (s, 1 H, H-13), 9.95 (sb, 1 H, H-11).

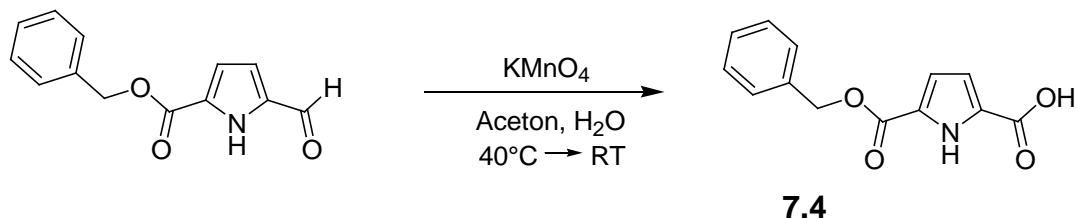
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 67.2 (C-5), 116.2 (C-8), 119.9 (C-9), 128.3 (C-7), 128.7 – 128.9 (C-1, C-2, C-3), 134.6 (C-10), 135.4 (C-4), 160.3 (C-6), 180.5 (C-12).

HR-MS (ESI, neg., MeOH): [M]⁻: m/z = 228.0666 (berechnet für C₁₃H₁₀NO₃: 228.0655).

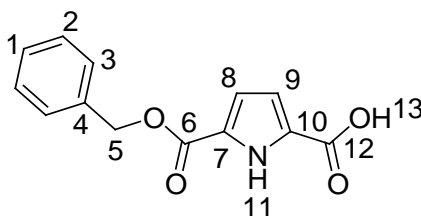
Schmelzpunkt: 99°C.

R_f (Cyclohexan / Ethylacetat / Dichlormethan 70:15:15) = 0.41.

5.2.8. 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester



3.93 g Formylpyrrolcarbonsäurebenzylester (17.15 mmol, 1 eq) wurden in 85 mL Aceton gelöst und mit 35 mL Wasser versetzt. Unter Rühren wurden innerhalb einer Stunde 5.42 g Kaliumpermanganat (34.31 mmol, 2 eq) portionsweise zugegeben. Das Gemisch wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt und 24 h bei RT gerührt. 299 mg Natriumdithionit (1.72 mmol, 0.1 eq) wurden zugegeben, das Gemisch 15 min gerührt, über Kieselgur filtriert und mit 40 mL NaOH (1 M in H₂O) gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit kalter HCl (2 M in H₂O) angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Es wurden 3.85 g 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester (15.7 mmol, 92 %) als farbloser Feststoff erhalten.



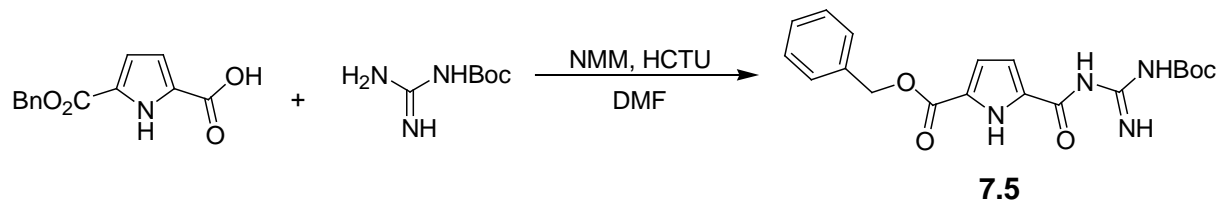
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 5.28 (s, 2 H, H-5), 6.76 (m, 1 H, H-9), 6.83 (m, 1 H, H-8), 7.38 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 12.56 (s, 1 H, H-11), 12.89 (sb, 1 H, H-13).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 65.5 (C-5), 115.1 (C-9), 115.6 (C-8), 125.9 (C-10), 127.9 (C-7), 128.0 – 128.4 (C-1, C-2, C-3), 136.2 (C-4), 159.6 (C-6), 161.2 (C-11).

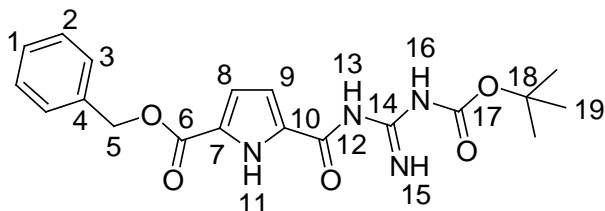
HR-MS (ESI, neg., MeOH): [M]⁻: m/z = 244.0626 (berechnet für C₁₃H₁₀NO₄: 244.0604).

Zersetzungspunkt: 234°C.

5.2.9. 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester



1.6 g 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäurebenzylester (6.52 mmol, 1 eq) wurden in 40 mL DMF gelöst, mit 1.6 mL NMM (14.35 mmol, 2.2 eq) und 2.97 g HCTU (7.18 mmol, 1.1 eq) versetzt, entgast und 30 min bei RT gerührt. 2.08 g Boc-Guanidin (13.05 mmol, 2 eq) wurden zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren in 115 mL Wasser eingetropft. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit eisgekühltem Wasser nachgewaschen und getrocknet. Es verblieben 2.34 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester (6.06 mmol, 93 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

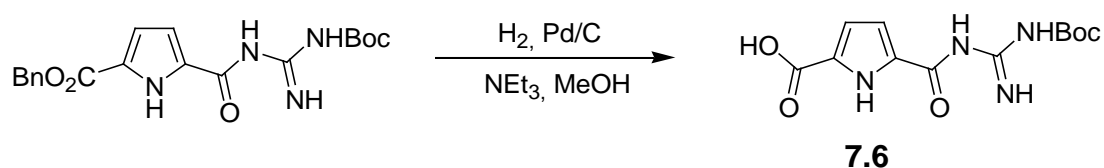


¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 5.30 (s, 2 H, H-5), 6.83 (m, 2 H, H-8, H-9), 7.38 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3), 8.57 (sb, 1H, NH), 5.31 (sb, 1H, NH), 10.70 (sb, 1H, NH), 11.62 (sb, 1H, NH).

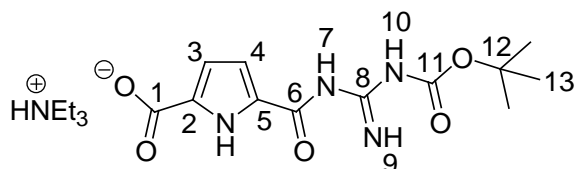
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 27.7 (C-19), 65.5 (C-5), 115.8 (C-8, C-9), 127.9 – 128.5 (C-1, C-2, C-3), 136.2 (C-4), 158.3 (C-12), 159.8 (C-6).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M⁺+H⁺]: *m/z* = 387.1716 (berechnet für C₁₉H₂₃N₄O₅: 387.1663), [M⁺+Na⁺]: *m/z* = 409.1532 (berechnet für C₁₉H₂₂NaN₄O₅: 409.1482).

Schmelzpunkt: 88°C.

5.2.10. 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure

4.4 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester (11.39 mmol, 1 eq) wurden in 60 mL Methanol suspendiert und mit 2.38 mL Triethylamin (1.73 g, 17.08 mmol, 1.5 eq) und katalytischen Mengen Pd / C (10 % Pd) versetzt. Das Gemisch wurde 15 h bei 40°C unter H₂-Atmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Kieselgur filtriert, mit einem Gemisch aus 30 mL Methanol und 1 mL Triethylamin nachgewaschen und getrocknet. Es wurden 3.56 g 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure (8.69 mmol, 79 %) erhalten.



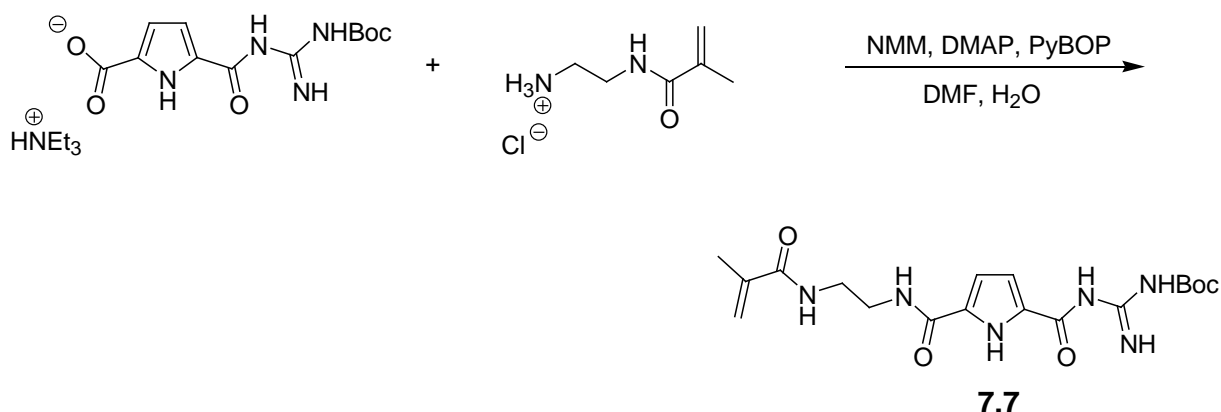
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.78 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 9 H, NEt₃), 1.44 (s, 9 H, H-15), 2.82 (q, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 6 H, NEt₃), 6.49 (m, 1 H, H-3/4), 6.76 (m, 1 H, H-3/4), 8.52 (sb, 1 H, NH), 9.32 (sb, 1 H, NH), 10.86 (sb, 1 H, NH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ [ppm] = 9.4 (NEt₃), 27.8 (C-15), 45.2 (NEt₃), 80.5 (C-14), 113.0 (C3/4), 114.0 (C3/4), 158.4 (C-2, C-5), 160.4 (C-12), 162.3 (C-1), 163.1 (C-7).

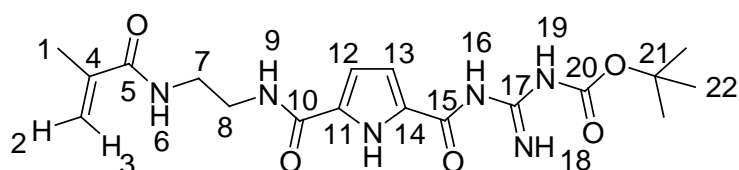
HR-MS (ESI, neg., MeOH): [M]: *m/z* = 295.1033 (berechnet für C₁₂H₁₅N₄O₅: 295.1048).

Schmelzpunkt: > 300°C.

5.2.11. 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)ethyl]amid



500 mg 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure (1.26 mmol, 1 eq), 415 μ L NMM (382 mg, 3.77 mmol, 3 eq), 400 mg DMAP (3.27 mmol, 2.6 eq) und 720 mg PyBOP (1.38 mmol, 1.1 eq) wurden in 40 mL DMF und 10 mL H₂O gelöst, entgast und 30 min bei RT gerührt. 269 mg 2-(2-Methacryloylamino)-ethylamin (1.64 mmol, 1.3 eq) wurden in 10 mL H₂O gelöst, zugegeben und drei Tage bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 250 mL H₂O versetzt und fünfmal mit je 100 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat / Methanol 3:1 gereinigt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde erneut mit Ethylacetat säulenchromatographisch gereinigt. Es verblieben 326 mg gelblich öliges 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)-ethyl]-amid (8.0 mmol, 64 %).



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.43 (s, 9 H, H-22), 1.92 (s, 3 H, H-1), 3.53 (m, 4 H, H-7, H-8), 5.31 (s, 1 H, H-2), 5.74 (s, 1 H, H-3), 6.69 (d, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, H-12/13), 6.83 (d, ³J_{H,H} = 3.9 Hz, H-12/13), 7.09 (m, 1 H, NH), 7.67 (m, 1 H, NH), 8.53 (sb, 1 H, NH), 9.07 (sb, 1 H, NH), 10.5 (sb, 1 H, NH).

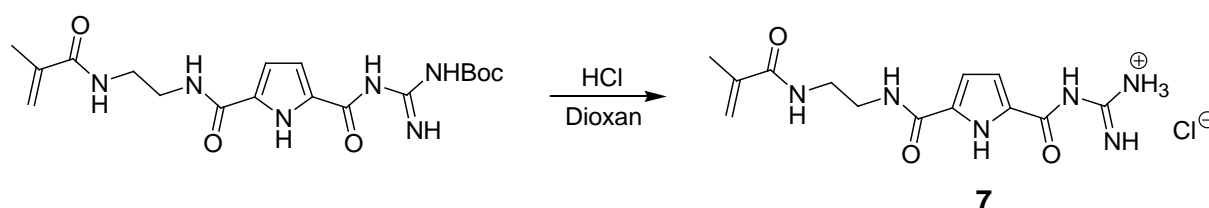
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 27.8 (C-22), 38.3 (C-8), 38.9 (C-7), 111.7 (C-12, C-13), 119.2 (C-2/3), 139.9 (C-4), 159.9 (C-10), 167.6 (C-5).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[M - H^+]$: $m/z = 405.1866$ (berechnet für $C_{18}H_{27}N_6O_5$: 405.1892).

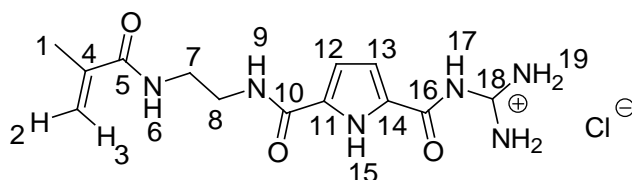
Schmelzpunkt: 24°C.

R_f (Ethylacetat) = 0.15.

5.2.12. 1*H*-Pyrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid



142 mg 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methacryloylamino)-ethyl]-amid (349 μ mol) wurden in 10 mL Dioxan gelöst. 6 mL HCl (konz.) wurden zugetropft und 24 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde getrocknet. Es verblieben 103 mg 1*H*-Pyrrol-5-guanidinocarbonyl-2-carbonsäure-[2-(2-methylacryloylamino)-ethyl]-amid (301 μ mol, 86 %) als farbloser Feststoff.

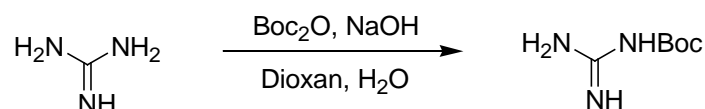


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.84 (s, 3 H, H-1), 3.24 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, 2 H, H-7), 3.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.7$ Hz, 2 H, H-8), 5.32 (s, 1 H, H-2), 5.66 (s, 1 H, H-3), 6.84 (m, 1 H, H-12/13), 7.40 (m, 1 H, H-12/13), 8.08 (m, 1 H, H-5), 8.44 (m, 4 H, H-19, H-20), 8.59 (m, 1 H, H-9, H-19), 11.78 (m, 1 H, H-17), 12.34 (m, 1 H, H-15).

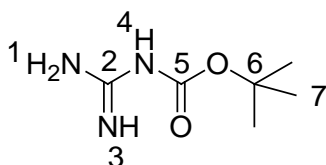
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 38.5 (C-8), 38.7 (C-7), 112.4 (C-12), 115.9 (C-13), 119.2 (C-3/2), 125.4 (C-11), 132.9 (C-14), 139.8 (C-4), 155.4 (C-18), 159.3 (C-10), 159.6 (C-16), 167.7 (C-5).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[M - H^+]$: $m/z = 307.1598$ (berechnet für $C_{13}H_{19}N_6O_3$: 307.1513).

Schmelzpunkt: > 300°C.

5.2.13. *N*-Boc-Guanidin

20.16 g NaOH (504 mmol, 5.5 eq) und 43.78 g Guanidiniumhydrochlorid (458 mmol, 5 eq) wurden in 90 mL Wasser gelöst und 30 min im Eisbad gerührt. 20 g Di-*tert*-butyldicarbonat (92 mmol, 1 eq) wurden in 100 mL Dioxan gelöst und langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 8 h im Eisbad und 15 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde viermal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es verblieben 14.22 g *N*-Boc-Guanidin (89.3 mmol, 98 %) als farbloser Feststoff.



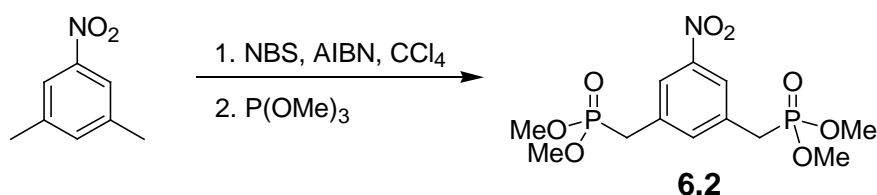
¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.33 (s, 9 H, H-6), 6.84 (sb, 3 H, H-1, H-3, H-4).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ [ppm] = 28.2 (C-7), 75.5 (C-6), 162.9 (C-5), 163.4 (C-2).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M + H⁺]: *m/z* = 160.10990 (berechnet für C₆H₁₄N₃O₂: 160.1081); [M + Na⁺]: *m/z* = 182.0913 (berechnet für C₆H₁₃N₃NaO₂: 182.0900).

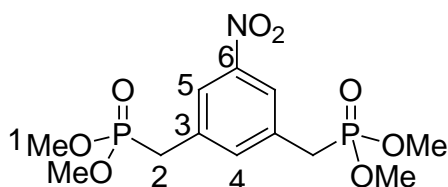
Zersetzungspunkt: 165 °C.

5.2.14. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol



10 g 5-Nitro-*m*-xylol (66 mmol, 1 eq) wurden in 200 mL Tetrachlormethan gelöst. Es wurden 24.67 g *N*-Bromsuccinimid (138.6 mmol, 2.1 eq) und 0.2 g AIBN (1.22 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch zum Rückfluss erhitzt, bis das gesamte Succinimid an der Oberflächenschwamm. Dieses wurde abfiltriert und mit wenig Tetrachlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde getrocknet. Es verblieben 20.39 g des Rohproduktgemisches, das ohne weitere Aufreinigung umgesetzt wurde.

20.39 g 3,5-Bis(brommethyl)nitrobenzol (66 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL Trimethylphosphit (21.29 g, 171.6 mmol, 2.6 eq) suspendiert und unter Rühren 5 h unter Rückfluss erhitzt. Das überschüssige Trimethylphosphit wurde abkondensiert. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan / Ethanol (19:1) säulenchromatographisch gereinigt. Es wurden 10 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol (27 mmol, 41 % über 2 Stufen) als gelbliches Öl erhalten.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.24 (d, ²J_{P,H} = 22.1 Hz, 4 H, H-2), 3.72 (d, ³J_{P,H} = 10.9 Hz, 12 H, H-1), 7.59 (s, 1 H, H-4), 8.04 (m, 2 H, H-5).

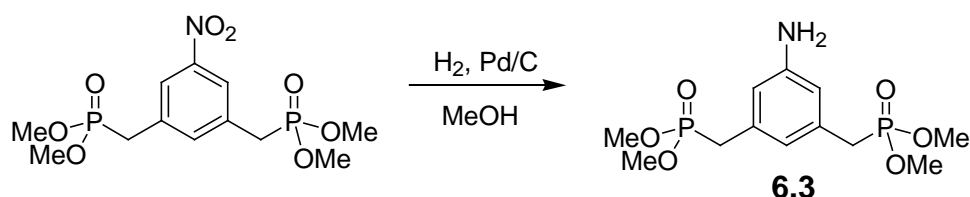
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 32.7 (C-2), 53.2 (C-1), 123.4 (C-4), 134.1 (C-5), 137.2 (C-3), 148.6 (C-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 26.8.

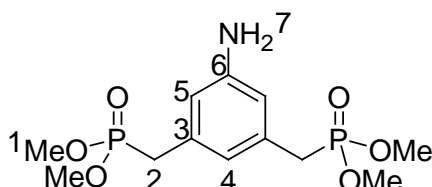
HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M + H⁺]: *m/z* = 368.0704 (berechnet für C₁₂H₂₀NO₈P₂: 368.0659); [M + Na⁺]: *m/z* = 390.0525 (berechnet für C₁₂H₁₉NNaO₈P₂: 390.0478).

R_f (Dichlormethan / Methanol 16:1) = 0.25.

5.2.15. 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin



5 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol (13.3 mmol, 1 eq) wurden in 150 mL Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen Pd / C (10 % Pd) versetzt und unter H₂-Atmosphäre 15 h bei RT gerührt. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert, mit wenig Methanol gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Es verblieben 4.64 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin (12.6 mmol, 95 %) als farbloses Öl.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.04 (d, ²J_{P,H} = 21.8 Hz, 4 H, H-2), 3.66 (d, ³J_{P,H} = 10.7 Hz, 12 H, H-1), 6.54 (s, 2 H, H-5), 6.57 (s, 1 H, H-4).

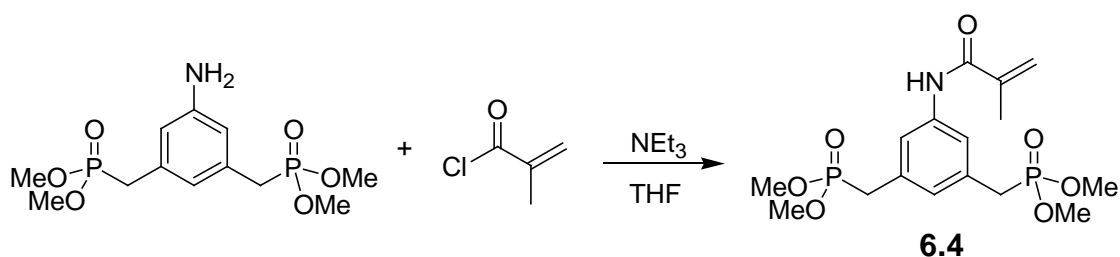
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 32.2 – 33.3 (C-2), 53.0 (C-1), 115.3 (C-5), 121.5 (C-4), 132.6 (C-3), 146.9 (C-6).

³¹P-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 28.9.

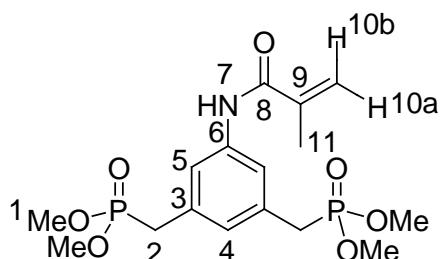
HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M + H⁺]: *m/z* = 338.0946 (berechnet für C₁₂H₂₂NO₆P₂: 338.0917); [M + Na⁺]: *m/z* = 360.0766 (calc. for C₁₂H₂₁NNaO₆P₂: 360.0736).

R_f (Dichlormethan / Methanol 19:1) = 0.12.

5.2.16. *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid



4.15 g 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin (11.3 mmol, 1 eq) und kat. Mengen an DMAP wurden in 30 mL Dichlormethan gelöst und mit 1.35 g Triethylamin (13.3 mmol, 1.18 eq) versetzt. Bei 0°C wurde eine Lösung aus 1.79 g Methacrylsäurechlorid (17.1 mmol, 1.51 eq) und 8 mL Dichlormethan langsam zugetropft und 1 h bei RT weitergerührt. Die organische Phase wurde mit 30 mL 0.6 M NaOH gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (DCM / MeOH 19:1). Es verblieben 3.89 g *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (9.6 mmol, 85 %) als farbloses Öl.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 2.04 (s, 3 H, H-11), 3.12 (d, ²J_{P,H} = 21.9 Hz, 4 H, H-2), 3.67 (d, ³J_{P,H} = 10.8 Hz, 12 H, H-1), 5.45 (s, 1 H, H-10a), 5.79 (s, 1 H, H-10b), 6.97 (sb, 1 H, H-7), 7.47 (s, 1 H, H-4), 7.73 (s, 2 H, H-5).

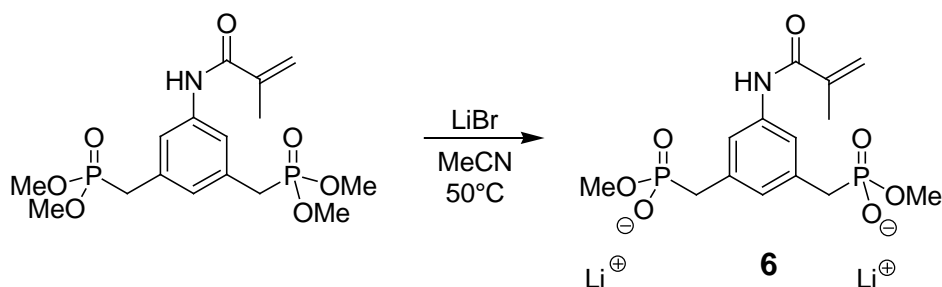
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 18.8 (C-11), 32.7 (C-2), 53.1 (C-1), 120.1 (C-10, C-4), 127.1 (C-5), 132.6 (C-9), 138.6 (C-3), 140.8 (C-6), 166.8 (C-8).

³¹P-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 28.3.

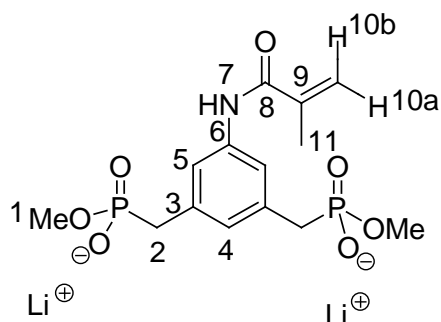
HR-MS (ESI, pos., MeOH): [M + H⁺]: *m/z* = 338.0946 (berechnet für C₁₂H₂₂NO₆P₂: 338.0917); [M + Na⁺]: *m/z* = 360.0766 (berechnet für C₁₂H₂₁NNaO₆P₂: 360.0736).

R_f (Dichlormethan / Methanol 19:1) = 0.09.

5.2.17. Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid



0.5 g *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (1.2 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 6 mL LiBr-Lösung (5 % in Acetonitril, 236 mg, 2.73 mmol, 2.2 eq) versetzt und unter AR-Atmosphäre bei 50°C 7 Tage gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde zentrifugiert, die klare Lösung abpipettiert. Der abgeschiedene farblose Feststoff wurde viermal mit je 5 mL Acetonitril und einmal mit 5 mL Diethylether gewaschen und getrocknet. Es wurden 449 mg Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (1.15 mmol, 93 %) als farbloser Feststoff erhalten.



¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ [ppm] = 2.03 (s, 3 H, H-11), 3.05 (d, ²J_{P,H} = 20.5 Hz, 4 H, H-2), 3.54 (d, ³J_{P,H} = 10.4 Hz, 12 H, H-1), 5.57 (s, 1 H, H-10a), 5.82 (s, 1 H, H-10b), 7.06 (s, 1 H, H-4), 7.23 (s, 2 H, H-5).

¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz): δ [ppm] = 17.8 (C-11), 33.9 (C-2), 51.9 (C-1), 121.5 (C-10), 121.6 (C-5), 128.2 (C-4), 135.8 (C-3), 136.7 (C-6), 139.9 (C-9), 171.1 (C-8).

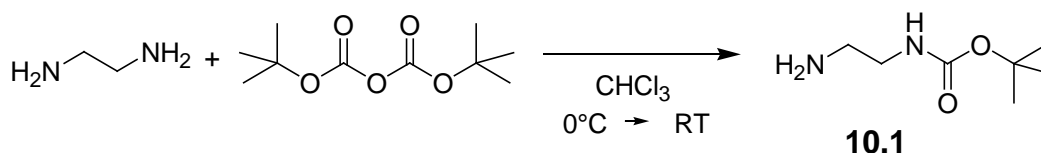
³¹P-NMR (D₂O, 200 MHz): δ [ppm] = 28.8.

HR-MS (ESI, neg., H₂O): [M⁻]: m/z = 382.0809 (berechnet für C₁₄H₁₉LiNO₇P₂: 382.0802); [M²⁻]: m/z = 187.5330 (berechnet für C₁₄H₁₉NO₇P₂: 187.5324).

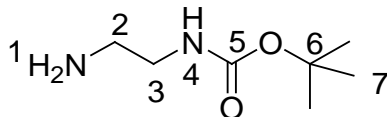
Schmelzpunkt: >300°C.

R_f (Dichlormethan / Methanol 19:1) = 0.

5.2.18. *N*-Boc-Ethylendiamin



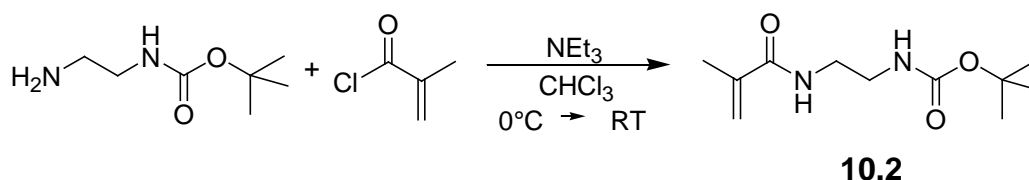
13.8 mL 1,2-Ethylendiamin (12.4 g, 206 mmol, 9 eq) wurden in 100 mL Chloroform gelöst und 30 min im Eisbad gerührt. 5 g Di-*tert*-butylcarbonat (22.9 mmol, 1 eq), wurden in 40 mL Chloroform gelöst, bei 0°C langsam zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der ölige Rückstand in 100 mL Wasser aufgenommen und der unlösliche Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde dreimal mit je 70 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es verblieben 2.9 g *N*-Boc-Ethylendiamin (18.1 mmol, 79 %) als gelbes Öl.



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.42 (s, 9 H, H-7), 1.52 (sb, 2 H, H-1), 2.78 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6$ Hz, 2 H, H-3), 3.15 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, 2 H, H-2), 4.95 (sb, 1 H, 4).

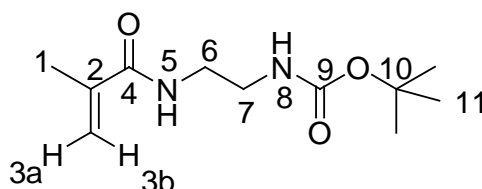
$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 125 MHz): δ [ppm] = 28.5 (C-6), 41.9 (C-2), 43.4 (C-3), 79.33 (C-6), 156.4 (C-5).

5.2.19. *N*-{2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]ethyl}methacrylamid



2.65 g *N*-Boc-Ethylendiamin (16.5 mmol, 1 eq) wurden mit 6.67 mL Triethylamin (4.87 g, 47.8 mmol, 2.9 eq) versetzt, in 30 mL Chloroform abs. gelöst und 30 min im Eisbad unter Ar-Atmosphäre gerührt. 1.7 mL Methacrylsäurechlorid (1.83 g, 17.5

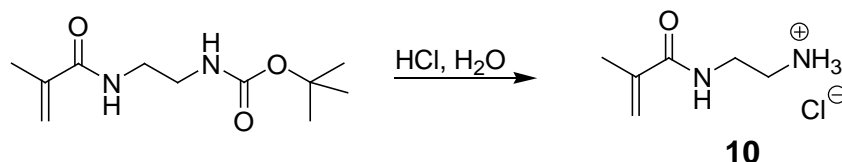
mmol, 1.1 eq) wurden in 20 mL Chloroform abs. gelöst, bei 0°C langsam zugetropft und 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde fünfmal mit je 30 mL Wasser extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst aus Diethylether / Hexan 3:5, dann aus Chloroform / Diethylether / Hexan 1:55:55 umkristallisiert. Es verblieben 2.26 g *N*-{2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino]ethyl}-methacrylamid (9.9 mmol, 60 %) als farbloses Öl.



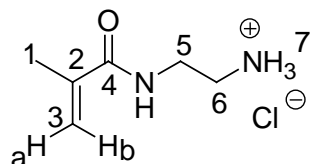
¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ [ppm] = 1.39 (s, 9 H, H-11), 1.91 (s, 3 H, H-1), 3.19 – 3.31 (m, 4 H, H-5, H-6), 5.20 (sb, 1 H, NH), 5.28 (s, 1 H, H-3a), 5.71 (s, 1 H, H-3b), 6.85 (sb, 1 H, NH).

¹³C-NMR (D₂O, 125 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 28.4 (C-11), 40.0 (C-7), 41.6 (C-6), 82.6 (C-10), 120.0 (C-3), 139.6 (C-2), 157.4 (C-9), 169.0 (C-4).

5.2.20. *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid



5 g *N*-{2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)-amino]-ethyl}-methacrylamid (22 mmol, 1eq) wurden mit 50 ml HCl (2 N in H₂O, 110 mmol, 5 eq) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Es verblieben 3.51 g *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid (21.34 mmol, 97 %) als farbloses Öl.

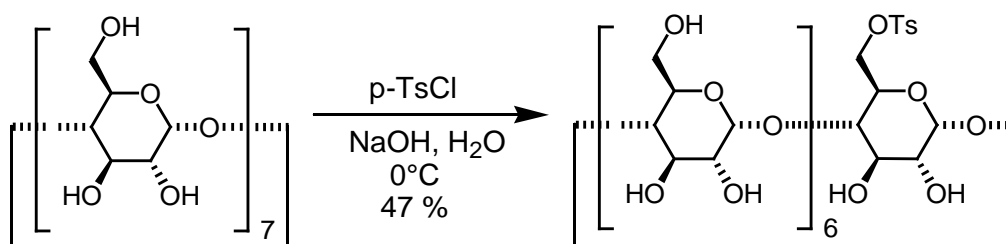


¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ (ppm) = 1.95 (s, 3 H, H-1), 3.20 (t, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2 H, H-6), 3.59 (t, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 2 H, H-5), 5.52 (s, 1 H, H-3a), 5.78 (s, 1 H, H-3b).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ (ppm) = 17.6 (C-1), 37.1 (C-6), 39.4 (C-5), 122.0 (C-3), 138.6 (C-2), 172.5 (C-4).

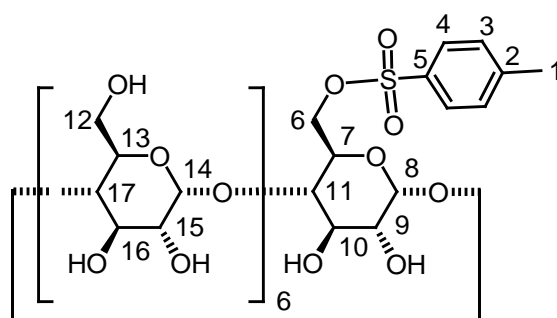
HR-MS (ESI, pos., H_2O): $[\text{M} + \text{H}^+]$: m/z = 129.1022 (berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$: 129.1022); $[\text{M} + \text{Na}^+]$: m/z = 151.0839 (berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}$: 151.0842).

5.2.21. 6^A-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin



9.1

5 g β -Cyclodextrin (4.4 mmol, 1 eq) wurden in 150 mL wässriger NaOH (420 mM, 2.5 g in 150 mL Wasser) gelöst und 30 min im Eisbad gerührt. 2 g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (10.5 mmol, 2.4 eq) wurden zugegeben und das Gemisch 2 h bei 0°C gerührt. Weitere 3 g *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (15.7 mmol, 3.6 eq) wurden zugegeben und für 3 h im Eisbad gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, mit 35 mL HCl (10 % in Wasser) versetzt und über Nacht eingefroren. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Es verblieben 2.66 g 6'-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (2.06 mmol, 47 %).



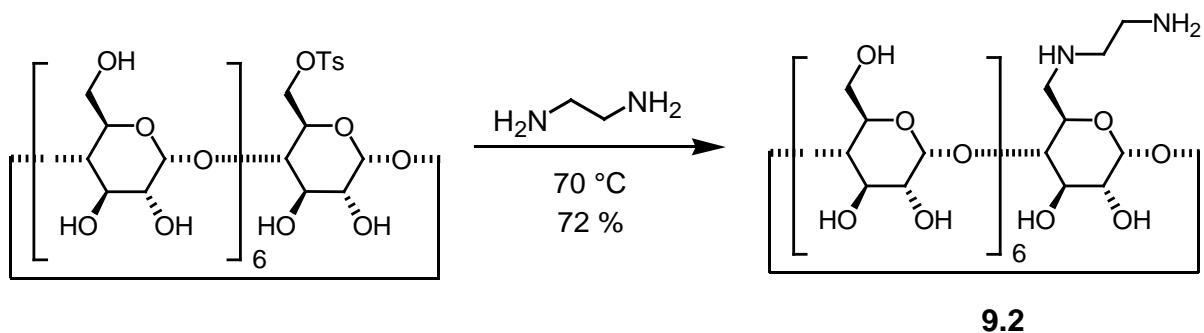
^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ [ppm] = 2.42 (s, 3 H, H-1), 3.21 – 4.00 (m, 42 H, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-15, H-16, H-17), 4.76 – 4.85 (m, 7 H, H-8, H-14), 7.43 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, 2 H, arom. Protonen), 7.74 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, 2 H, arom. Protonen).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ [ppm] = 21.2 (C-1), 59.9 (C-6, C-12), 71.9 – 81.5 (C-7, C-9, C-10, C-11, C-13, C-15, C-16, C-17), 101.9 (C-8, C-14), 127.6 – 132.7 (C-3, C-4), 137.5 (C-5), 144.8 (C-2).

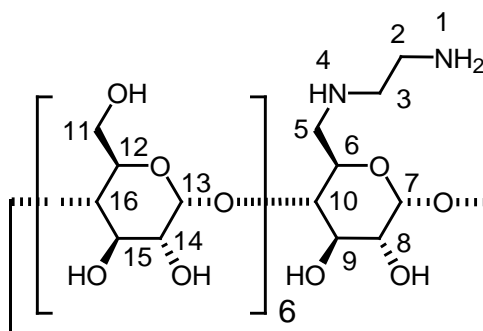
HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[\text{M} + \text{Na}^+]$: m/z = 1311.3628 (berechnet für $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{37}\text{S}$: 1311.3678).

Zersetzungspunkt: 177 °C.

5.2.22. 6^A-Deoxy-6^A-*N*-(2-aminoethylimino)- β -cyclodextrin



1 g 6'-*o*-(*p*-Tolylsulfonyl)- β -cyclodextrin (780 μmol , 1 eq) wurden in 5 mL Ethylen-diamin (4.49 g, 75 mmol, 96 eq) gelöst und 24 h auf 70°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockne eingeeengt. Nach Zugabe von 50 mL Ethanol wurde für 30 min unter Rückfluss erhitzt, nach dem Abkühlen der ausgefallene farblose Feststoff abfiltriert und in 50 mL Wasser aufgenommen. Die wäßrige Phase wurde fünfmal mit je 50 mL Chloroform extrahiert und zur Trockne eingeeengt. Der farblose Rückstand wurde in 3 mL Wasser aufgenommen und in 30 mL Ethanol eingetropft. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und getrocknet. Es verblieben 659 mg 6^A-Deoxy-6^A-*N*-(2-Aminoethylimino)- β -cyclodextrin (590 μmol , 76 %) als farbloser Feststoff.

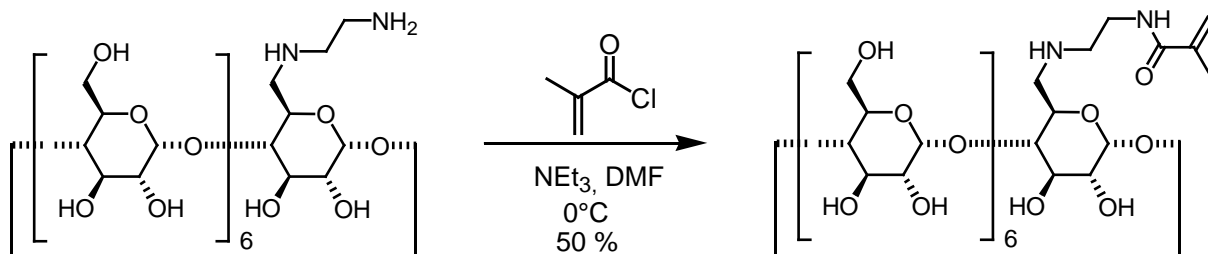


$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 3.58 (m, H-10, H-16), 3.66 (m, H-8, H-14), 3.88 (m, H-2, H-3, H-5, H-6, H-11, H-12), 3.97 (m, H-9, H-15), 5.07 (m, 7 H, H-7, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 125 MHz): δ [ppm] = 60.4 (C-2, C-3, C-5, C-11), 71.9 (C-6, C-12), 72.4 (C-8, C-14), 73.2 (C-9, C-15), 81.2 (C-10, C-16), 101.6 (C-7), 101.9 (C-13).

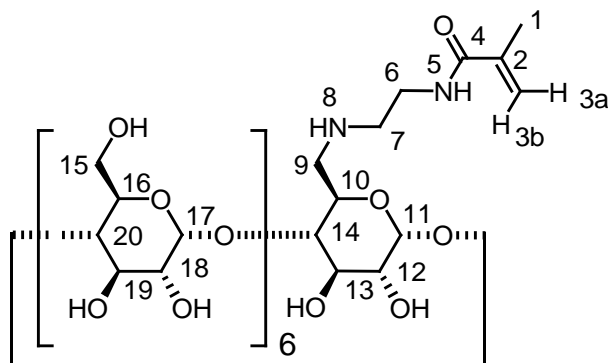
HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[\text{M} + \text{H}^+]$: m/z = 1177.4359 (berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{34}$: 1177.4352).

5.2.23. 6^A-Deoxy-6^A-N-[(2-aminoethylimino)acrylamid]-β-cyclodextrin



9

656 mg 6^A-Deoxy-6^A-N-(2-Aminoethylimino)-β-cyclodextrin (557 μmol, 1 eq) wurden in 40 mL DMF und 94 μL Triethylamin (68 mg, 688 μmol, 1.2 eq) gelöst und 30 min im Eisbad gerührt. 119 μL Methacrylsäurechlorid (128 mg, 1.23 mmol, 2.2 eq) wurden in 8 mL DMF gelöst und langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min im Eisbad und 18 h bei RT gerührt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1.5 mL Wasser aufgenommen und in 15 mL Methanol eingetropft. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Es verblieben 275 mg 6^A-Deoxy-6^A-N-[(2-aminoethylimino)acrylamid]-β-cyclodextrin (234 μmol, 42 %).



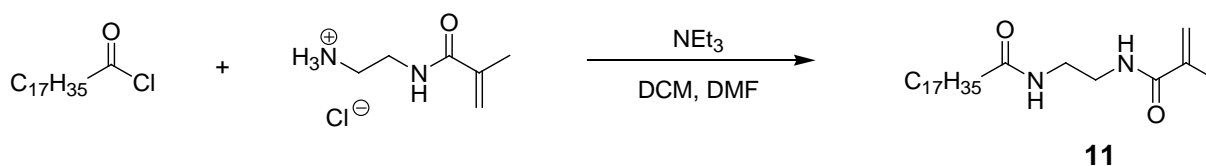
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz): δ [ppm] = 1.92 (s, 3 H, H-1), 3.44 – 3.94 (m, 42 H, H-6, H-7, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-20), 5.08 (m, 7 H, H-11, H-17), 5.75 (s, 1 H, H-3a), 6.14 (s, 1 H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 125 MHz): δ [ppm] = 17.5 (C-1), 60.2 (C-6, C-7, C-9, C-15), 71.9 – 81.2 (C-10, C-12, C-13, C-14, C-16, C-18, C-19, C-20), 102.0 (C-11, C-17), 127.0 (C-3), 136.1 (C-2), 171.7 (C-4).

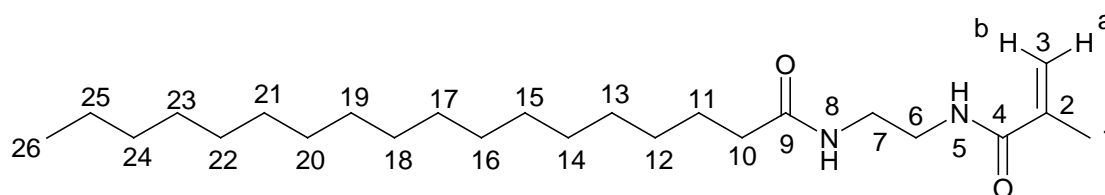
HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[\text{M} + \text{H}^+]$: m/z = 1177.4359 (berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{34}$: 1177.4352).

Schmelzpunkt: 58 °C.

5.2.24. Stearinsäure-[2-(2-methylacryloylamino)ethyl]amid



460 mg *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid (2.79 mmol, 1 eq) wurden in 5 mL DMF und 15 mL Dichlormethan gelöst, mit 856 μL Triethylamin versetzt und 30 min im Eisbad gerührt. 931 mg Stearinsäurechlorid wurden in 6 mL Dichlormethan gelöst und langsam bei 0°C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt. Der ausgefallene farblose Feststoff wurde abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wurde dreimal mit je 15 mL NaOH (1 M in H_2O) und dreimal mit je 15 mL HCl (1 M in H_2O) extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Es verblieben 552 mg Stearinsäure-[2-(2-methylacryloylamino)-ethyl]amid (1.394 mmol, 50 %) als farbloser Feststoff.



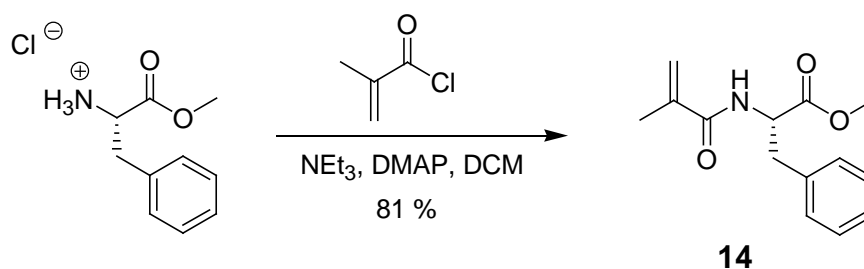
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 0.87 (t, $^3J_{\text{H,H}} =$, 3 H, H-26), 1.25 (m, 28 H, H-12 – H-25), 1.60 (m, 2 H, H-11), 1.96 (s, 3 H, H-1), 2.19 (2 H, H-10), 3.45 (m, 4 H, H-6, H-7), 5.34 (s, 1 H, H-3a), 5.76 (s, 1 H, H-3b), 6.37 (sb, 1 H, NH), 6.83 (sb, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 14.3 (C-26), 18.7 (C-1), 22.8 (C-25), 25.4 – 32.1 (C-11 – C-24), 36.8 (C-10), 40.0 – 41.1 (C-6, C-7), 120.4 (C-3), 139.4 (C-2), 169.4 (C-4), 175.2 (C-9).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[\text{M} + \text{H}^+]$: m/z = 395.3687 (berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_2$: 395.3632); $[\text{M} + \text{Na}^+]$: m/z = 417.3506 (berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_2$: 417.3451), $[\text{M}_2 + \text{Na}^+]$: m/z = 811.7098 (berechnet für $\text{C}_{48}\text{H}_{92}\text{N}_4\text{NaO}_4$: 811,7016).

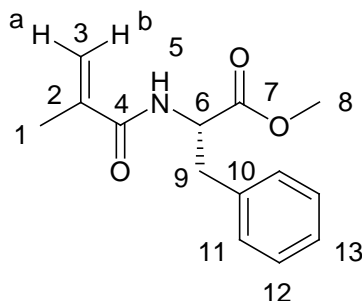
Schmelzpunkt: 112°C.

5.2.25. 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester



510 mg H-Phe-OMe Hydrochlorid (2.53 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst, mit 1.24 mL Triethylamin (900 mg, 8.9 mmol, 3.5 eq) und katalytischen Mengen DMAP versetzt und 30 min in Eisbad gerührt. 530 μL Methacrylsäurechlorid (572 mg, 5.47 mmol, 2.1 eq) wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst, im Eisbad langsam zugetropft und 2 h im Eisbad und 15 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 30 mL NaOH (0.6 M in Wasser) gewaschen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über

Kieselgel gereinigt (Cyclohexan / Ethylacetat 4:1). Es verblieben 467 mg 2-(2-Methylacryloylamino)-3-phenylpropionsäuremethylester (2.04 mmol, 81 %) als farbloses Öl.



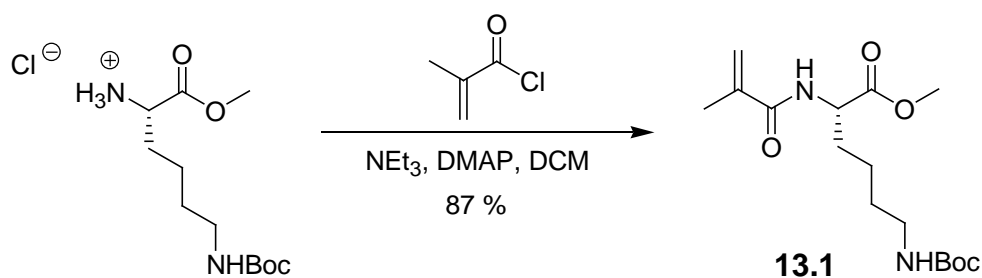
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.92 (s, 3 H, 1), 3.15 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, 1 H, H-9), 3.17 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$ Hz, 1 H, H-9), 3.73 (s, 3 H, H-4), 4.92 (m, 1 H, H-6), 5.33 (s, 1 H, H-3a), 5.65 (s, 1 H, H-3b), 6.20 (sb, 1 H, H-5), 7.07 – 7.28 (m, 5 H, H-11, H-12, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1), 37.9 (C-9), 52.5 (C-5), 53.3 (C-6), 120.3 (C-3), 127.3 (C-13), 128.7 (C-11), 129.4 (C-12), 135.9 (C-10), 139.6 (C-2), 167.8 (C-4), 172.2 (C-7).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[\text{M} + \text{H}^+]$: $m/z = 270.1116$ (berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}$: 270.1101).

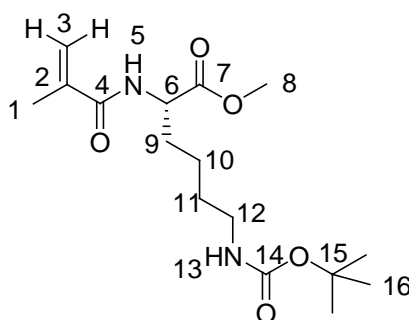
R_f (Cyclohexan / EtOAc 4:1) = 0.18.

5.2.26. 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäuremethylester



500 mg H-Lys(Boc)-OMe Hydrochlorid (1.68 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst, mit 821 μL Triethylamin (597 mg, 5.9 mmol, 3.5 eq) und

katalytischen Mengen DMAP versetzt und 30 min im Eisbad gerührt. 326 μL Methacrylsäurechlorid wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst, im Eisbad zugetropft und 15 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit 30 mL NaOH (0.6 M in Wasser) gewaschen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (Cyclohexan / Ethylacetat 2:1) gereinigt. Es verblieben 478 mg 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäuremethylester (1.46 mmol, 87 %) als farbloses Öl.

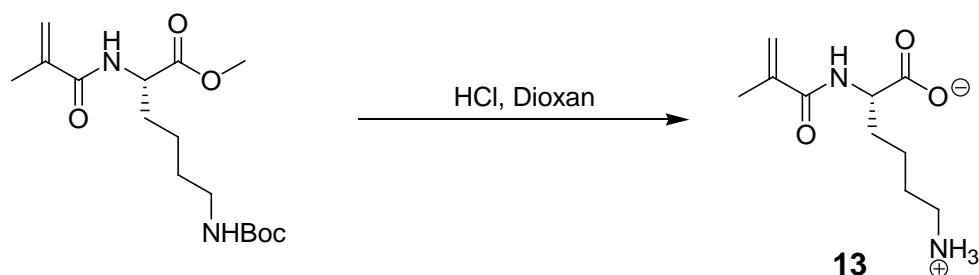


$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.34 (m, 2 H, H-10), 1.42 (s, 9 H, H-16), 1.49 (m, 2 H, H-11), 1.70 (m, 1 H, H-9), 1.89 (m, 1 H, H-9), 1.97 (s, 3 H, H-1), 3.10 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = Hz, H-12), 3.75 (s, 3 H, H-8), 4.59 (sb, 1 H, H-13), 4.65 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.2 Hz, 1 H, H-6), 5.37 (s, 1 H, H-3a), 5.75 (s, 1 H, H-3b), 6.36 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 18.7 (C-1), 22.6 (C-10), 28.5 (C-16), 29.7 (C-11), 32.4 (C-9), 52.1 (C-8), 52.6 (C-6), 120.4 (C-3), 139.6 (C-2), 156.2 (C-14), 168.2 (C-4), 173.2 (C-7).

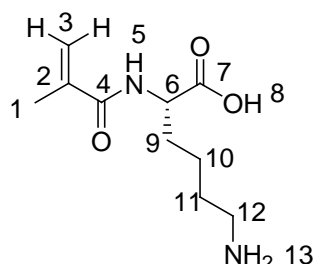
R_f (Cyclohexan / EtOAc 2:1) = 0.15.

5.2.27. 6-Amino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure



463 mg 6-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäuremethylester (1.41 mmol) wurden in 20 mL Dioxan gelöst. 10 mL konz. HCl wurden langsam

zugetropft und bei RT 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Es verblieben 300 mg 6-Amino-2-(2-methylacryloylamino)hexansäure (1.4 mmol, quant.) als gelbliches Öl.



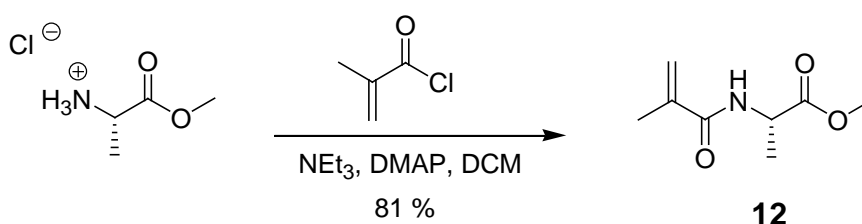
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.47 (m, 2 H, H-10), 1.70 (m, 2 H, H-11), 1.86 (m, 1 H, H-9), 1.94 (s, 3 H, H-1), 1.99 (m, 1 H, H-9), 3.00 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2 H, H-12), 4.43 (m, 1 H, H-6), 5.51 (s, 1 H, H-3a), 5.73 (s, 1 H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ [ppm] = 17.7 (C-1), 22.3 (C-10), 26.3 (C-11), 29.9 (C-9), 39.3 (C-12), 52.8 (C-6), 121.6 (C-3), 138.8 (C-2), 172.4 (C-4), 175.8 (C-7).

HR-MS (ESI, neg., MeOH): $[\text{M}]^-$: $m/z = 213.1250$ (berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: 213.1234).

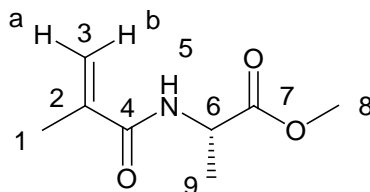
R_f (Cyclohexan / EtOAc 2:1) = 0.

5.2.28. 2-(2-Methylacryloylamino)propionsäuremethylester



514 mg H-Ala-OMe Hydrochlorid (4.99 mmol, 1 eq) wurden in 20 mL Dichlormethan abs. gelöst, mit 2.43 mL Triethylamin (1.766 g, 17.45 mmol, 3.5 eq) und katalytischen Mengen DMAP versetzt und 30 min im Eisbad gerührt. 965 μL Methacrylsäurechlorid (1.042 g, 9.97 mmol, 2 eq) wurden in 8 mL Dichlormethan gelöst, im Eisbad zugetropft und 1 h im Eisbad und 15 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 30 mL NaOH (0.6 M in Wasser) gewaschen und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es

verblieben 421 mg 2-(2-Methylacryloylamino)-propionsäuremethylester (2.46 mmol, 50 %) als farbloses Öl.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.43 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 3 H, H-9), 1.97 (s, 3 H, H-1), 3.75 (s, 3 H, H-8), 4.63 (quint, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 1 H, H-6), 5.36 (s, 1 H, H-3a), 5.74 (s, 1 H, H-3b), 6.40 (sb, 1 H, H-5).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ [ppm] = 18.6 (C-1, C-9), 48.2 (C-8), 52.6 (C-6), 120.3 (C-3), 139.6 (C-2), 167.8 (C-4), 173.8 (C-7).

HR-MS (ESI, pos., MeOH): $[M + H]^+$: $m/z = 194.803$ (berechnet für C₈H₁₃NNaO₃: 194.0788).

R_f (Cyclohexan / EtOAc 2:1) = 0.27.

5.3. Synthese der Polymere

5.3.1. Stammlösungen

Die Stammlösungen der verschiedenen Monomere sowie des AIBN wurden gemäß Tabelle 5.1 angesetzt und nach dem *freeze and exhaust* Prinzip entgast. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, der Kolben evakuiert und das Gemisch langsam aufgetaut. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs wurde der Kolben mit Argon belüftet.

Tab. 5.1: Stammlösungen der Monomere und des AIBN.

Monomer	Einwaage / mg	V(DMF) / mL	V(H ₂ O) / mL
BP 6	100	0.5	1
CBS 7	100	2	
CD 9	100		1
NTA 8	100		1
Dodecyl 5	100	1	
Cyclohexyl 1	100	1	
Ammonium 10	100		1
Boronsäure 4	100	1	
Glucose 2	100	0.25	1
Dansyl 3	100	1	
Stearinsäure 11	100	1	
Phenylalanin 14	100	1	
Lysin 13	100		1
AIBN	100	1	

5.3.2. allgemeine Arbeitsvorschrift der Polymerisation

Die gewünschten Verhältnisse der Monomere wurden in mit Argon geflutete Reaktionsgefäße gegeben, mit 5 mol% AIBN versetzt und 7 Tage bei 60°C im Thermomixer geschüttelt.

Die Reaktionslösungen wurden lyophilisiert und mittels ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie und GPC auf Vollständigkeit der Polymerisation und Molekulargewicht untersucht.

5.3.3. Polymere

Die Polymerisation erfolgte statistisch, daher werden im Folgenden nur die Monomerverhältnisse angegeben. Die Struktur der Copolymere kann wie in Abb. 5.1 dargestellt beschrieben werden, Krein, Dreieck und Quadrat symbolisieren die unterschiedlichen Monomere.

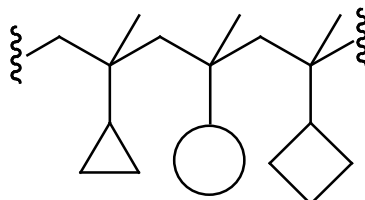


Abb. 5.1: Grundstruktur der Copolymere: Dreieck, Kreis und Quadrat symbolisieren verschiedene Monomerreste.

Von den in Wasser nicht löslichen Polymeren werden lediglich die Zusammensetzungen angegeben. Die weitere Charakterisierung sowie Untersuchungen in Enzymassays wurden nicht durchgeführt.

5.3.3.1. Polymer 1

Monomer 6 5 eq 33.3 mg 85 μmol

Monomer 2 1 eq 4.3 mg 17 μmol

Monomer 3 2 eq 12.5 mg 35 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.17 (sb, 3 H), 3.16 (sb, 9 H), 6.82 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.6 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 150\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 105\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 2\,530\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 19\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.2. Polymer 2

Monomer 6 5 eq 26.7 mg 43 μmol

Monomer 8 3 eq 15.4 mg 39 μmol

Monomer 2 1 eq 2.2 mg 10 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.30 (sb, 9 H), 3.50 (sb, 7 H), 7.03 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 165\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 107\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 27\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 12\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.3. Polymer 3

Monomer 6 5 eq 33.3 mg 85 μmol

Monomer 5 1 eq 4.6 mg 17 μmol

Monomer 2 1 eq 4.3 mg 17 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.21 (sb, 6 H), 3.40 (sb, 8 H), 6.98 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.7 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 112\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 73\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 10\,662\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 11\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.4. Polymer 4

Monomer 6	3 eq	30.0 mg	77 μmol
Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
Monomer 2	2 eq	12.9 mg	52 μmol
Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.5. Polymer 5

Monomer 6	3 eq	20.0 mg	51 μmol
Monomer 9	1 eq	21.6 mg	17 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 3	0.5 eq	3.1 mg	9 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.4 – 3.9 (mb, 88 H), 5.0 (sb, 7 H), 5.5 (s, 0.4 H), 5.8 (s, 0.4 H), 7.0 (sb, 9 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 150\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 107\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 654\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 25\,000\text{ g/mol}$

Ca. 7 % Monomere enthalten.

5.3.3.6. Polymer 6

Monomer 6	3 eq	20.0 mg	51 μmol
Monomer 9	1 eq	21.6 mg	17 μmol
Monomer 8	1 eq	7.9 mg	17 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 3	0.5 eq	3.1 mg	9 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 (mb, 6 H), 3.4 – 4.0 (mb, 95 H), 5.0 (sb, 7 H), 5.6 (s, 0.7 H), 5.8 (s, 0.8 H), 7.0 (sb, 12 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 121\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 85\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 175\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 15\,000\text{ g/mol}$

Ca. 11 % Monomere.

5.3.3.7. Polymer 7

Monomer 6	3 eq	30.0 mg	77 μmol
Monomer 8	1 eq	10.4 mg	26 μmol
Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.29 (sb, 5 H), 3.43 (sb, 9 H), 7.02 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.7 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 114\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 87\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 15\,763\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 17\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.8. Polymer 8

Monomer 6	3 eq	10.0 mg	26 μmol
Monomer 9	1 eq	10.4 mg	26 μmol
Monomer 2	3 eq	6.4 mg	26 μmol
Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 3.40 – 3.90 (mb, 102 H), 5 (sb, 3 H) 7.0 (sb, 3 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 179\,000$ g/mol

$M_n = 105\,000$ g/mol

Polyacrylat-Standard $M_w = 2\,568\,000$ g/mol

$M_n = 14\,000$ g/mol

5.3.3.9. Polymer 9

Monomer 6 1 eq 20.0 mg 52 μ mol

Monomer 8 1 eq 20.7 mg 52 μ mol

Monomer 2 1 eq 12.8 mg 52 μ mol

Monomer 3 0.5 eq 9.4 mg 26 μ mol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.29 (sb, 12 H), 3.50 (sb, 11 H) 7.03 (sb, 3 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 115\,000$ g/mol

$M_n = 82\,000$ g/mol

Polyacrylat-Standard $M_w = 345\,000$ g/mol

$M_n = 14\,000$ g/mol

5.3.3.10. Polymer 10

Monomer 6	1 eq	5.0 mg	13 μmol
Monomer 9	3 eq	48.0 mg	39 μmol
Monomer 2	1 eq	3.2 mg	13 μmol
Monomer 3	0.5 eq	2.4 mg	7 μmol

Schlecht löslich.

5.3.3.11. Polymer 11

Monomer 6	1 eq	10.0 mg	26 μmol
Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
Monomer 2	3 eq	19.0 mg	77 μmol
Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.50 – 3.61 (sb, 31 H), 3.85 (sb, 20 H), 7.05 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 147\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 83\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 1\,224\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 11\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.12. Polymer 12

Monomer 6	1 eq	20.0 mg	52 μmol
Monomer 5	1 eq	13.8 mg	52 μmol
Monomer 2	1 eq	12.8 mg	52 μmol
Monomer 3	0.5 eq	9.4 mg	26 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.1 (sb, 23 H), 3.4 - 3.8 (mb, 24 H), 7.0 (sb, 6 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 114\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 79\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 862\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 9\,400\text{ g/mol}$

5.3.3.13. Polymer 13

Monomer 6	1 eq	10.0 mg	26 μmol
Monomer 8	3 eq	30.7 mg	77 μmol

Monomer 2 1 eq 6.4 mg 26 μmol

Monomer 3 0.5 eq 9.4 mg 13 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.3 (mb, 30 H), 3.06 (mb, 10 H), 3.5 (mb, 9 H), 7.05 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 121\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 78\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 848\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 12\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.15. Polymer 15

Monomer 6 1 eq 10.0 mg 26 μmol

Monomer 8 3 eq 30.7 mg 77 μmol

Monomer 2 1 eq 6.4 mg 26 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.8 (mb, 28 H), 3.5 (mb, 18 H), 5.39 (s, 0.3 H), 5.63 (s, 0.3 H), 7.05 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 63\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 51\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 15\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 6\,100\text{ g/mol}$

Ca. 7 % Monomere enthalten.

5.3.3.16. Polymer 16

Monomer 7	3 eq	13.2 mg	39 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 5	1 eq	3.5 mg	13 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	5 eq	16.0 mg	65 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	2.4 mg	7 μmol
------------------	--------	--------	-------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.17. Polymer 17

Monomer 7	3 eq	17.6 mg	51 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 8	1 eq	6.9 mg	17 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	3 eq	12.8 mg	52 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	3.1 mg	9 μmol
------------------	--------	--------	-------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.18. Polymer 18

Monomer 7	3 eq	17.6 mg	51 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 8	1 eq	21.6 mg	17 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	3.1 mg	9 μmol
------------------	--------	--------	-------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.19. Polymer 19

Monomer 7	1 eq	13.2 mg	39 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 8	1 eq	15.5 mg	39 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	9.6 mg	39 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	7.1 mg	39 μmol
------------------	--------	--------	--------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.20. Polymer 20

Monomer 7	1 eq	17.8 mg	52 μmol
Monomer 5	1 eq	13.8 mg	52 μmol
Monomer 2	1 eq	12.8 mg	52 μmol
Monomer 3	0.5 eq	9.4 mg	26 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.21. Polymer 21

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
Monomer 3	0.5 eq	27.9 mg	77 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.22. Polymer 22

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
Monomer 8	3 eq	30.7 mg	77 μmol
Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol

Monomer 3	0.1 eq	1.3 mg	4 μmol
------------------	--------	--------	-------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.23. Polymer 23

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 9	3 eq	95.9 mg	77 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol
------------------	--------	--------	--------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.24. Polymer 24

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	3 eq	19.0 mg	77 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol
------------------	--------	--------	--------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.25. Polymer 25

Monomer 7	1 eq	4.5 mg	13 μmol
Monomer 9	3 eq	48.0 mg	39 μmol
Monomer 2	1 eq	3.2 mg	13 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.26. Polymer 26

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
Monomer 2	3 eq	19.0 mg	77 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.27. Polymer 27

Monomer 7	1 eq	17.8 mg	52 μmol
Monomer 5	1 eq	13.8 mg	52 μmol
Monomer 2	1 eq	12.8 mg	52 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.28. Polymer 28

Monomer 7	1 eq	5.9 mg	17 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	5 eq	21.4 mg	87 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 3	3 eq	18.6 mg	51 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.29. Polymer 29

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 5	1 eq	6.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	5 eq	32.2 mg	130 μmol
------------------	------	---------	---------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.30. Polymer 30

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 5	1 eq	6.9 mg	26 μmol
Monomer 2	5 eq	32.2 mg	130 μmol
Monomer 4	0.5 eq	9.4 mg	26 μmol

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.31. Polymer 31

Monomer 7	1 eq	4.5 mg	13 μmol
Monomer 2	10 eq	32.2 mg	130 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.4 – 3.9 (mb, 70 H), 5.2 (sb, 10 H), 5.4 (s, 0.3 H), 5.7 (s, 0.3 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard	$M_w = 67\,000\text{ g/mol}$
	$M_n = 23\,000\text{ g/mol}$
Polyacrylat-Standard	$M_w = 91\,000\text{ g/mol}$
	$M_n = 1\,100\text{ g/mol}$

5.3.3.32. Polymer 32

Monomer 7	1 eq	2.3 mg	7 μmol
------------------	------	--------	-------------------

Monomer 2 20 eq 32.2 mg 130 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.4 – 3.9 (mb, 140 H), 5.1 (sb, 20 H), 5.5 (s, 1 H), 5.7 (s, 1 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 87\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 30\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 276\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 1\,500\text{ g/mol}$

5.3.3.33. Polymer 33

Monomer 6 1 eq 10.0 mg 26 μmol

Monomer 9 1 eq 32.4 mg 26 μmol

Monomer 2 1 eq 6.4 mg 26 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.5 – 3.8 (mb, 77 H), 5.05 (sb, 7 H), 7.05 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8 (s).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 198\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 106\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard

 $M_w = 25\,302\,000\text{ g/mol}$ $M_n = 18\,000\text{ g/mol}$ 5.3.3.34. Polymer 34

Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 3	0.2 eq	1.9 mg	5 μmol
------------------	--------	--------	-------------------

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.5 – 3.9 (mb, 48 H), 5.05 (sb, 7 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard

 $M_w = 7\,100\text{ g/mol}$ $M_n = 6\,700\text{ g/mol}$

Ca.20 % Monomere.

5.3.3.35. Polymer 35

Monomer 8	2 eq	30.7 mg	77 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	4.7 mg	13 μmol
------------------	--------	--------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 - 1.8 (mb, 18 H), 3.6 (sb, 33 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 97\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 65\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 139\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 8\,300\text{ g/mol}$

5.3.3.36. Polymer 36

Monomer 7	1 eq	17.8 mg	52 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 10	1 eq	8.6 mg	52 μmol
-------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	2 eq	25.6 mg	104 μmol
------------------	------	---------	---------------------

Nicht wasserlöslich.

5.3.3.37. Polymer 37

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 10	5 eq	21.4 mg	130 μmol
-------------------	------	---------	---------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 (mb, H), 3.1 (sb, 17 H), 3.4 (sb, 27 H), 3.8 (sb, 4 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 1\,970\text{ g/mol}$

$M_n = 1\,950\text{ g/mol}$

5.3.3.38. Polymer 38

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 8	1 eq	10.3 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 10	1 eq	4.3 mg	26 μmol
-------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Nicht löslich.

5.3.3.39. Polymer 39

Monomer 7	1 eq	8.9 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 10	1 eq	4.3 mg	26 μmol
-------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 3.4 – 4.0 (mb, 61 H), 5.0 (sb, 7 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 6\,600\text{ g/mol}$
 $M_n = 6\,400\text{ g/mol}$

5.3.3.40. Polymer 40

Monomer 8 1 eq 30.9 mg 78 μmol

Monomer 1 1 eq 12.9 mg 78 μmol

Monomer 2 1 eq 19.2 mg 78 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 (mb, 17H), 3.7 (sb, 22 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 95\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 72\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 98\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 18\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.41. Polymer 41

Monomer 7 1 eq 17.8 mg 52 μmol

Monomer 1	1 eq	8.6 mg	52 μmol
Monomer 10	2 eq	17.1 mg	104 μmol
Monomer 2	1 eq	12.8 mg	52 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 0.9 – 1.2 (mb, 11 H), 3.1 – 3.8 (mb, 21 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 2\,500\text{ g/mol}$
 $M_n = 2\,300\text{ g/mol}$

5.3.3.42. Polymer 42

Monomer 8	1 eq	30.9 mg	78 μmol
Monomer 1	1 eq	12.9 mg	78 μmol
Monomer 2	1 eq	19.2 mg	78 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 (mb, 17H), 3.7 (sb, 22 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 105\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 74\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 322\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 12\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.43. Polymer 43

Monomer 8	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 9	1 eq	10.3 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Schlecht löslich.

5.3.3.44. Polymer 44

Monomer 8	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 5	1 eq	10.3 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Schlecht löslich.

5.3.3.45. Polymer 45

Monomer 8	1 eq	30.9 mg	78 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 4	1 eq	19.5 mg	78 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	19.2 mg	78 μmol
------------------	------	---------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 (mb, H), 3.1 (sb, 17 H), 3.4 (sb, 27 H), 3.8 (sb, 4 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 62\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 40\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 22\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 2\,600\text{ g/mol}$

5.3.3.46. Polymer 46

Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 4	1 eq	6.5 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
------------------	------	--------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 3.4 – 3.7 (mb, 65 H), 5.0 (sb, 7 H), 5.5 (s, 2 H), 5.8 (s, 2 H), 7.5 (sb, 4H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 6\,700\text{ g/mol}$

$M_n = 6\,400\text{ g/mol}$

>50 % Monomere.

5.3.3.47. Polymer 47

Monomer 7 1 eq 17.8 mg 52 μmol

Monomer 4 1 eq 13.0 mg 52 μmol

Monomer 2 1 eq 12.8 mg 52 μmol

Schlecht löslich.

5.3.3.48. Polymer 48

Monomer 7 1 eq 5.9 mg 17 μmol

Monomer 11 1 eq 6.9 mg 17 μmol

Monomer 2 10 eq 43.0 mg 170 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 0.9 – 2.0 (sb, 33 H), 3.4 – 4.0 (mb, 80 H), 5.2 (sb, 7 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 7\,400\text{ g/mol}$

$M_n = 7\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 7\,300\text{ g/mol}$

$M_n = 500\text{ g/mol}$

5.3.3.49. Polymer 49

Monomer 7	1 eq	3.0 mg	9 μ mol
Monomer 11	1 eq	3.4 mg	9 μ mol
Monomer 2	20 eq	43.0 mg	170 μ mol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 0.9 – 2.0 (sb, 33 H), 3.4 – 4.0 (mb, 150 H), 5.2 (sb, 7 H), 6.8 (sb, 1 H), 7.1 (sb, 1 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 50\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 30\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 12\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 2\,300\text{ g/mol}$

5.3.3.50. Polymer 50

Monomer 6	1 eq	10.0 mg	26 μ mol
Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μ mol
Monomer 11	1 eq	6.4 mg	26 μ mol
Monomer 2	1 eq	10.3 mg	26 μ mol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.3 (mb, 33 H), 3.4 – 3.9 (mb, 69 H), 7.0 (sb, 3 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 144\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 108\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 709\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 5\,900\text{ g/mol}$

5.3.3.51. Polymer 51

Monomer 6 1 eq 10.0 mg 26 μmol

Monomer 9 1 eq 32.4 mg 26 μmol

Monomer 11 1 eq 6.4 mg 26 μmol

Monomer 2 3 eq 19.2 mg 26 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.5 (mb, 33 H), 3.3 – 4.0 (mb, 83 H), 5.0 (sb, 3H), 7.0 (sb, 3 H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 87\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 49\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 348\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 5\,600\text{ g/mol}$

5.3.3.52. Polymer 52

Monomer 6	5 eq	26.0 mg	43 μmol
Monomer 8	3 eq	15.4 mg	29 μmol
Monomer 14	3 eq	7.2 mg	29 μmol
Monomer 2	1 eq	2.2 mg	9 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.5 (mb, 33 H), 3.3 – 4.0 (mb, 83 H), 5.0 (sb, 3H), 7.0 (sb, 3 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 94\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 58\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 111\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 7\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.53. Polymer 53

Monomer 6	5 eq	33.3 mg	85 μmol
Monomer 5	1 eq	4.6 mg	17 μmol
Monomer 14	3 eq	12.8 mg	52 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.5 (mb, 23 H), 3.4 (mb, 65 H), 7.0 – 7.5 (mb, 40 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 79\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 47\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 62\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 5\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.54. Polymer 54

Monomer 6 3 eq 30.0 mg 77 μmol

Monomer 8 1 eq 10.4 mg 26 μmol

Monomer 14 3 eq 19.3 mg 77 μmol

Monomer 2 1 eq 6.4 mg 26 μmol

Monomer 3 0.5 eq 4.7 mg 13 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.2 (mb, 6 H), 3.2 – 3.6 (mb, 67 H), 7.0 – 7.5 (sb, 27 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 139\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 64\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 456\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 7\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.55. Polymer 55

Monomer 6	5 eq	33.3 mg	85 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 3	2 eq	12.5 mg	35 μmol
Monomer 14	1 eq	4.3 mg	17 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 3.5 (sb, 73 H), 7.0 (sb, 26 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.5.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 92\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 62\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 43\,000\text{ g/mol}$
 $M_n = 7\,600\text{ g/mol}$

5.3.3.56. Polymer 56

Monomer 6	5 eq	26.7 mg	43 μmol
Monomer 8	3 eq	15.4 mg	39 μmol

Monomer 2 1 eq 2.2 mg 10 μmol

Monomer 14 1 eq 2.4 mg 10 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.3 (sb, 6 H), 3.5 (sb, 70 H), 7.0 (sb, 20 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.7.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 133\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 99\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 236\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 22\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.57. Polymer 57

Monomer 6 5 eq 33.3 mg 85 μmol

Monomer 2 1 eq 4.3 mg 17 μmol

Monomer 5 1 eq 4.6 mg 17 μmol

Monomer 14 1 eq 4.3 mg 17 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.1 – 1.5 (mb, 23 H), 3.2 – 3.7 (mb, 65 H), 7.0 (sb, 20 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 109\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 66\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 95\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 80\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.58. Polymer 58

Monomer 6 3 eq 30.0 mg 77 μmol

Monomer 8 1 eq 10.4 mg 26 μmol

Monomer 2 1 eq 6.4 mg 26 μmol

Monomer 3 0.5 eq 4.7 mg 13 μmol

Monomer 14 1 eq 6.4 mg 26 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.3 (sb, 6 H), 3.4 (sb, 55 H), 7.0 (sb, 27 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 111\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 77\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 80\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 12\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.59. Polymer 59

Monomer 6	5 eq	33.3 mg	85 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 5	1 eq	4.6 mg	17 μmol
Monomer 13	1 eq	8.0 mg	17 μmol

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.3 (sb, 6 H), 3.4 (sb, 55 H), 7.0 (sb, 27 H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.5.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 194\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 152\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 58\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 24\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.60. Polymer 60

Monomer 6	3 eq	20.0 mg	52 μmol
Monomer 9	1 eq	21.6 mg	17 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 3	0.5 eq	3.1 mg	9 μmol
Monomer 13	1 eq	7.9 mg	17 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.3 – 1.5 (mb, 6 H), 3.4 – 4.0 (mb, 91 H), 7.0 (sb, 12H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 155\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 84\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 1\,742\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 15\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.61. Polymer 61

Monomer 6	1 eq	20.0 mg	52 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 5	1 eq	13.8 mg	52 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 2	1 eq	12.8 mg	52 μmol
------------------	------	---------	--------------------

Monomer 3	0.5 eq	9.4 mg	26 μmol
------------------	--------	--------	--------------------

Monomer 13	3 eq	24.0 mg	52 μmol
-------------------	------	---------	--------------------

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.0 – 1.8 (mb, 29 H), 3.4 – 3.9 (mb, 27 H), 7.1 (sb, 6H).

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 158\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 90\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 878\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 12\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.62. Polymer 62

Monomer 6	1 eq	10.0 mg	26 μmol
Monomer 9	1 eq	32.4 mg	26 μmol
Monomer 2	1 eq	6.4 mg	26 μmol
Monomer 13	1 eq	12.0 mg	26 μmol

^1H -NMR (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 1.5 – 1.7 (mb, 6 H), 3.6 – 4.0 (mb, 66 H), 5.0 (sb, 7 H), 7.1 (sb, 3 H).

^{31}P -NMR (D_2O , 300 MHz): δ (ppm) = 23.7.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard	$M_w = 123\,000\text{ g/mol}$
	$M_n = 72\,000\text{ g/mol}$
Polyacrylat-Standard	$M_w = 289\,000\text{ g/mol}$
	$M_n = 10\,000\text{ g/mol}$

5.3.3.63. Polymer 63

Monomer 6	5 eq	33.3 mg	85 μmol
Monomer 14	3 eq	12.8 mg	52 μmol
Monomer 2	1 eq	4.3 mg	17 μmol
Monomer 3	2 eq	12.5 mg	35 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 3.3 – 3.6 (mb, 87 H), 7.0 – 7.5 (sb, 42 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 100\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 68\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard $M_w = 88\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 9\,000\text{ g/mol}$

Ca. 5 % Monomeranteil.

5.3.3.64. Polymer 64

Monomer 6 1 eq 6.7 mg 17 μmol

Monomer 9 1 eq 21.6 mg 17 μmol

Monomer 13 3 eq 24.0 mg 52 μmol

Monomer 2 1 eq 4.3 mg 17 μmol

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ (ppm) = 1.6 (mb, 18 H), 3.4 – 3.9 (mb, 87 H), 5.1 (sb, 7 H) 7.1 (sb, 3 H).

³¹P-NMR (D₂O, 120 MHz): δ (ppm) = 23.8.

Gelpermeationschromatographie:

Poly(ethylenglycol)-Standard $M_w = 99\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 62\,000\text{ g/mol}$

Polyacrylat-Standard

$M_w = 2\,538\,000\text{ g/mol}$

$M_n = 7\,500\text{ g/mol}$

5.4. Enzyminhibierungen

5.4.1. Chymotrypsin

Zur Messung der Chymotrypsinaktivität wird die Hydrolyse des Substrats, *N*-Benzoyl-Tyrosin-*p*-nitroanilin, und die damit verbundene Freisetzung von *p*-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt.

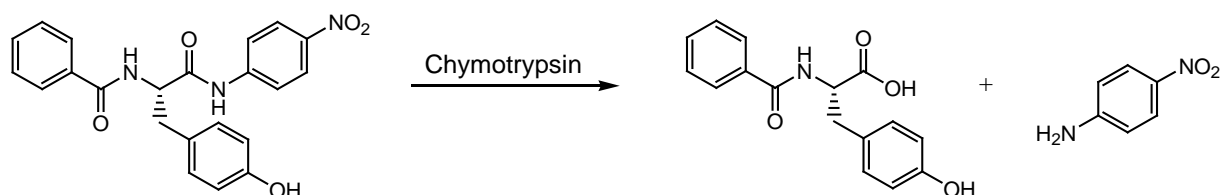


Abb. 5.2: Hydrolytische Spaltung von *N*-Benzoyl-Tyr-*p*-nitroanilin durch Chymotrypsin.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Puffer	80 mM Tris-HCl, pH 7.8
Chymotrypsin	3.97 mg/mL in 1 mM HCl
Substrat	1.18 mM in MeOH / H ₂ O 3:2

5.4.1.1. Übersichtsspektrum

Zur Vermessung eines UV-Übersichtsspektrums wurden folgende Proben verwendet:

Tab. 5.2: Probenzusammensetzung bei der Messung des UV-Übersichtsspektrums

	Chymotrypsin / μL	Puffer / μL	Substrat / μL
Substrat	0	47.5	47.5
Substrat + Chymotrypsin	5	47.5	47.5

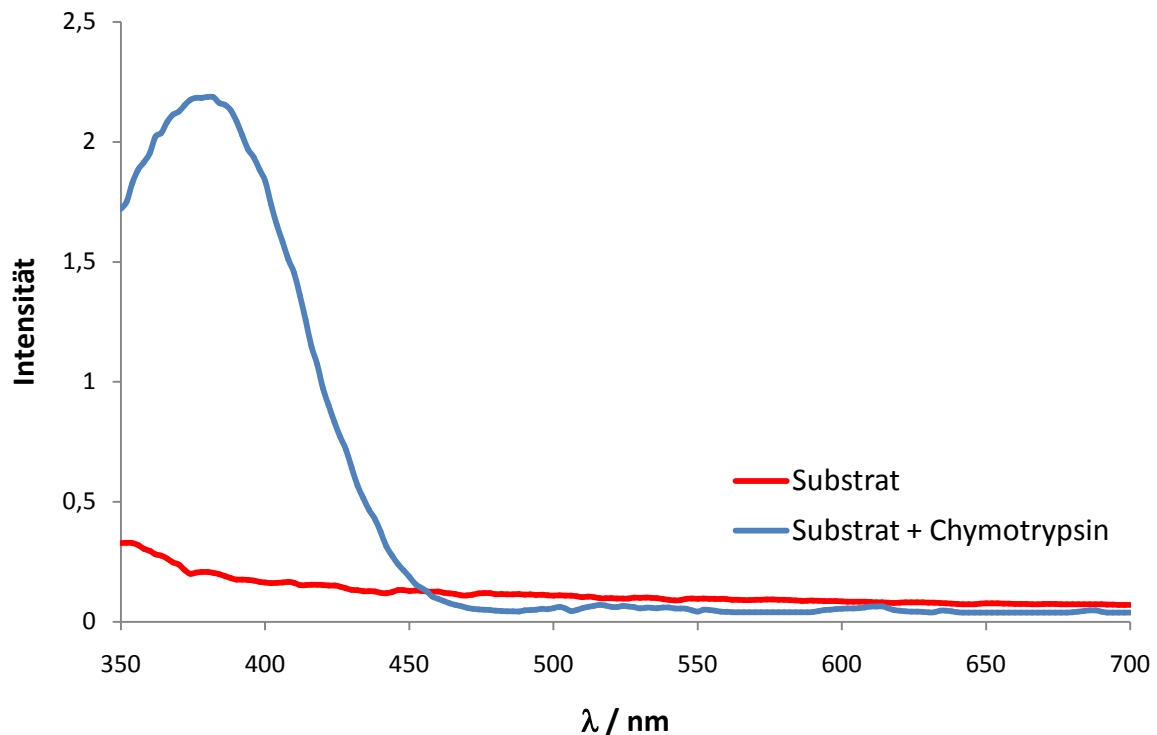


Abb. 5.3: UV-Übersichtsspektrum des Substrats (rot) und des gespaltenen Substrats (blau).

5.4.1.2. Enzymkinetik

Zur Messung der Enzymaktivität des Chymotrypsins wurden die oben angegebenen Lösungen verwendet. Das Gesamtprobenvolumen betrug 100 μL .

Tab. 5.3: Probenzusammensetzung des Chymotrypsin-Enzymassays.

5 μL	Chymotrypsin
5 μL	Polymer-Lösung (Wasser in den Kontrollansätzen)
Inkubation (1 h bei 25°C)	
42.5 μL	Puffer
47.5 μL	Substrat

Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Zunahme an freiem *p*-Nitroanilin wurde über 30 min alle 20 s gemessen, vor jeder Messung wurde die Probe 4 s geschüttelt.

Das Screening der Polymere erfolgte mit Polymerstammlösungen der Konzentration 20 mg/mL.

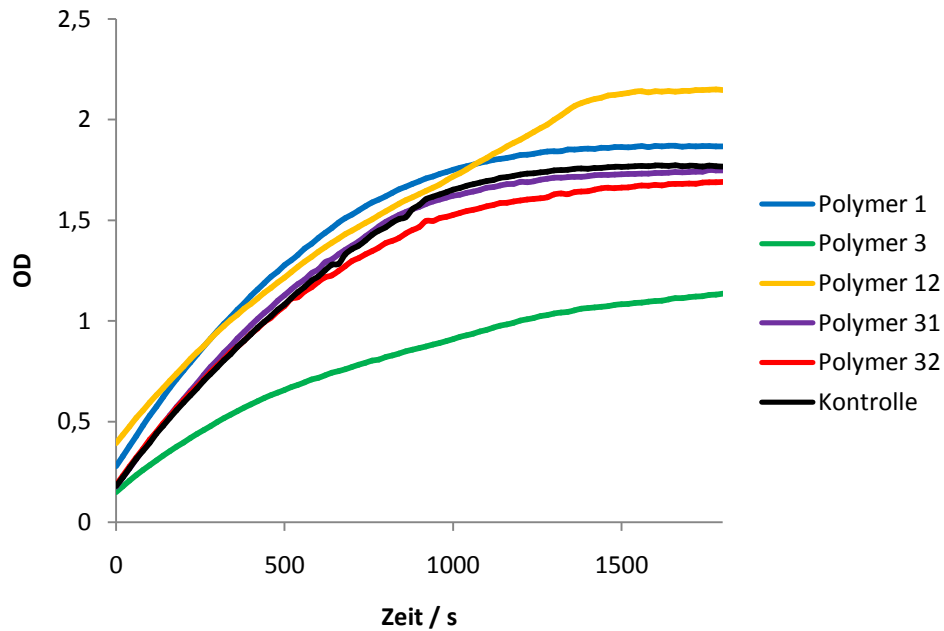


Abb. 5.4: Screening der Polymere 1, 3, 12, 31 und 32 auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

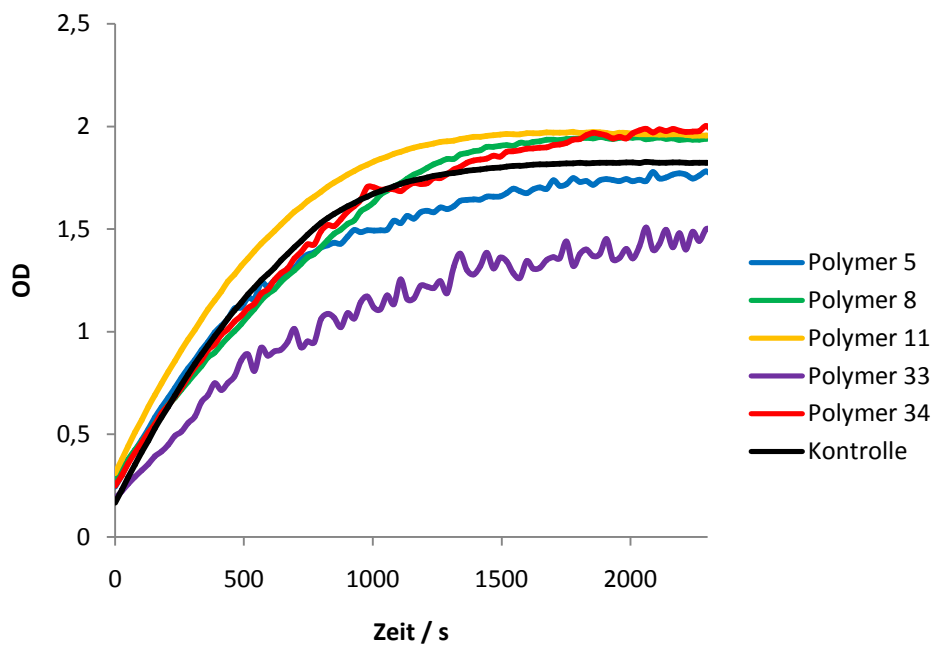


Abb. 5.5: Screening der Polymere 5, 8, 11, 33 und 34 auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

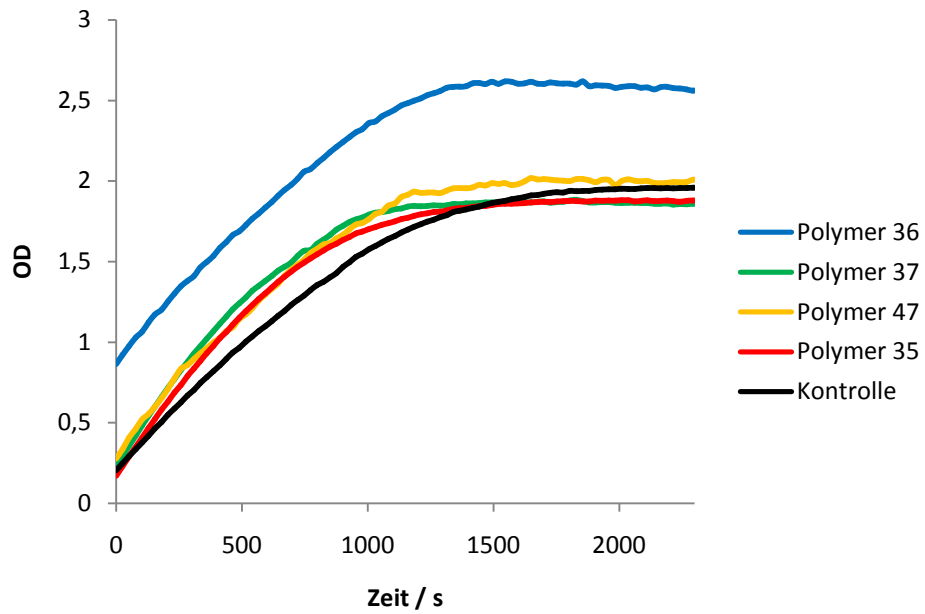


Abb. 5.6: Screening der Polymere **36**, **37**, **47** und **35** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

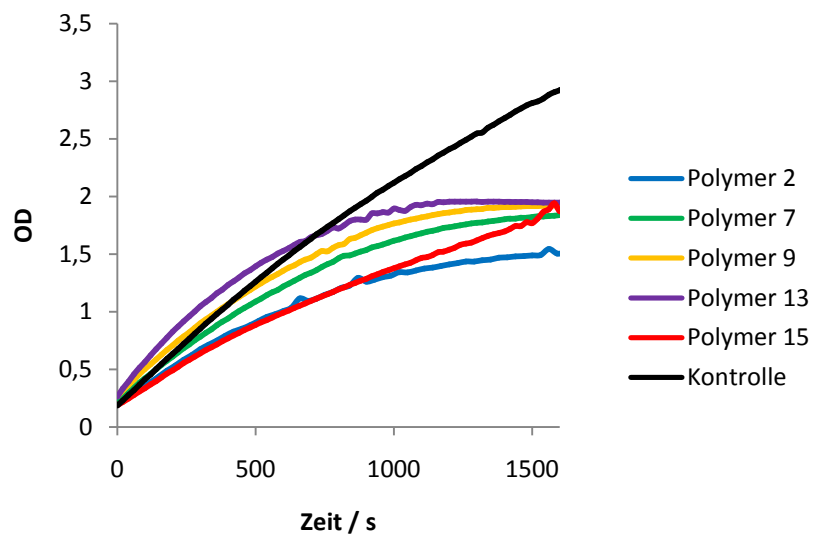


Abb. 5.7 Screening der Polymere **2**, **7**, **9**, **13** und **15** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

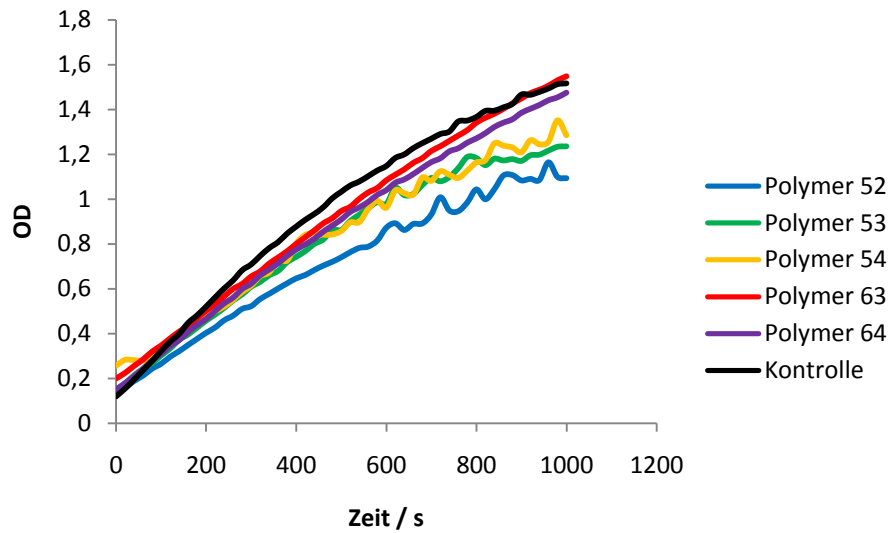


Abb. 5.8: Screening der Polymere **52**, **53**, **54**, **63** und **64** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

Das einzige Polymer, das einen schwachen Einfluss auf die Chymotrypsin-Aktivität zeigt, ist das Polymer **3**.

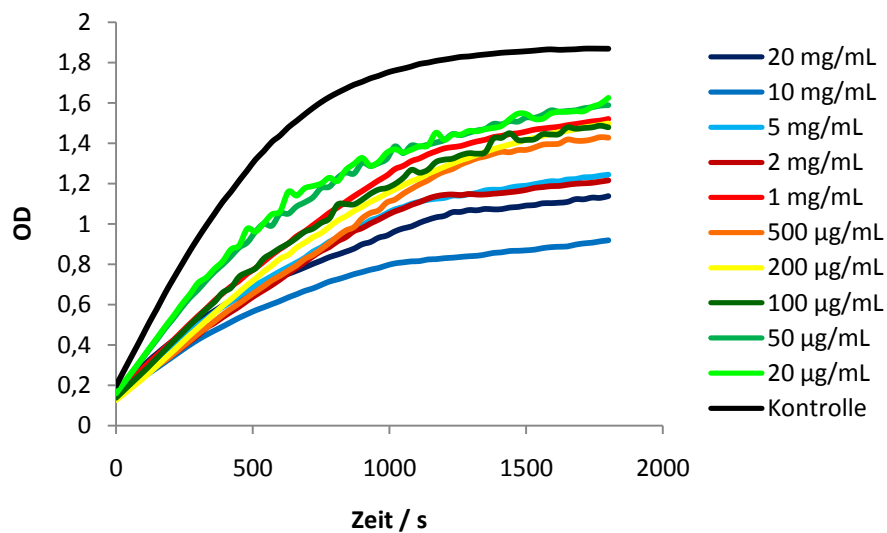


Abb. 5.9: Polymer **3** gegen Chymotrypsin.

Mit dem literaturbekannten Inhibitor Aprotinin wurde der IC_{50} -Wert mit Chymotrypsin bestimmt.

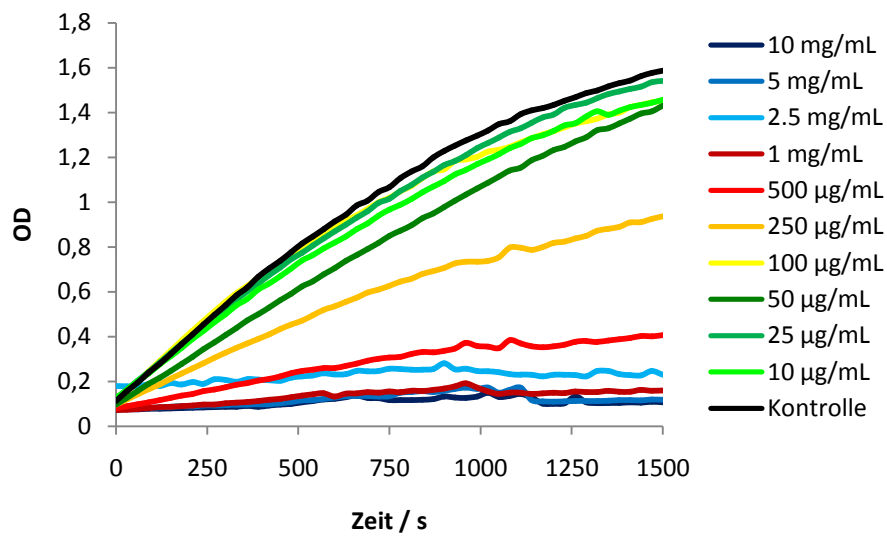


Abb. 5.10: Inhibierung von Chymotrypsin mit dem bekannten Inhibitor Aprotinin.

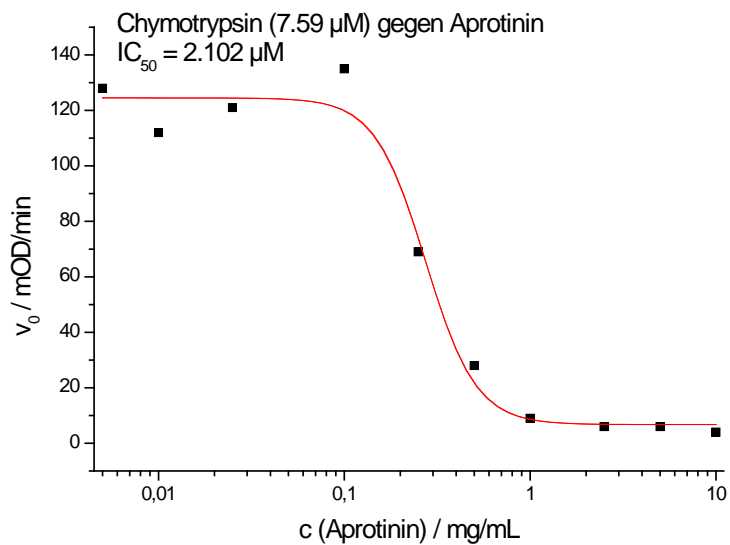


Abb. 5.11: IC_{50} -Kurve von Chymotrypsin mit dem literaturbekannten Inhibitor Aprotinin.

5.4.2. Trypsin

Zur Messung der Trypsinaktivität wird die Hydrolyse des Substrats, *N*-Benzoyl-D,L-arginin-*p*-nitroanilin (BAPNA), und die damit verbundene Freisetzung von *p*-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt.

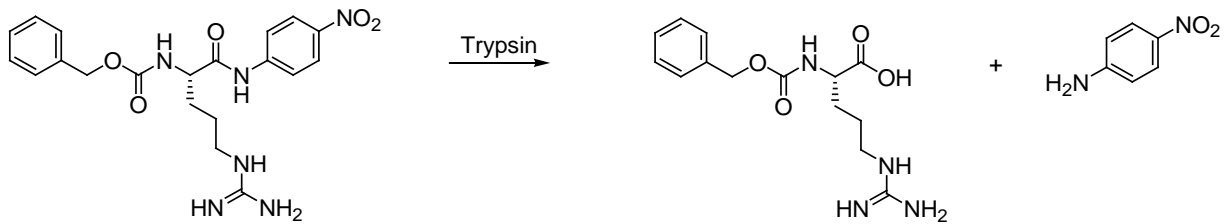


Abb. 5.12: Hydrolytische Spaltung von BAPNA durch Trypsin.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Puffer	75 mM Na ₂ HPO ₄ , 75 mM Tris, pH 4.0
Trypsin	2 mg/mL in 0.1 M HCl
BAPNA	0.3 mM (in möglichst wenig DMSO gelöst, auf 0.3 mM mit Puffer aufgefüllt)

5.4.2.1. Übersichtsspektrum

Zur Vermessung eines UV-Übersichtsspektrums wurden folgende Proben verwendet:

Tab. 5.4: Probenzusammensetzung bei der Messung des UV-Übersichtsspektrums

	Trypsin / μ L	Substrat / μ L
BAPNA	0	500
BAPNA + Trypsin	25	500

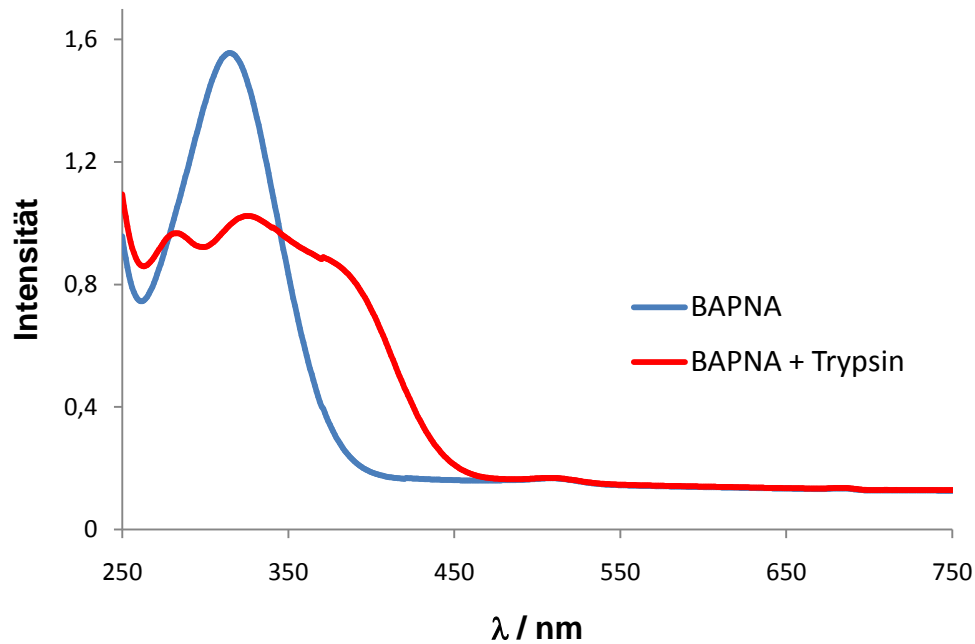


Abb. 5.13: UV-Übersichtsspektrum des Substrats (blau) und des gespaltenen Substrats (rot).

5.4.2.2. Enzymkinetik

Zur Messung der Enzymaktivität des Trypsins wurden die oben angegebenen Lösungen verwendet. Das Gesamtprobenvolumen betrug 110 μL .

Tab. 5.5: Probenzusammensetzung des Trypsin-Enzymassays.

5 μL	Trypsin
5 μL	Polymer-Lösung (Wasser in den Kontrollansätzen)
Inkubation (2 h bei 25°C)	
100 μL	BAPNA

Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Zunahme an freiem *p*-Nitroanilin wurde über 30 min alle 30 s gemessen, vor jeder Messung wurde die Probe 4 s geschüttelt.

Das Screening der Polymere erfolgte mit Polymerstammlösungen der Konzentration 20 mg/mL.

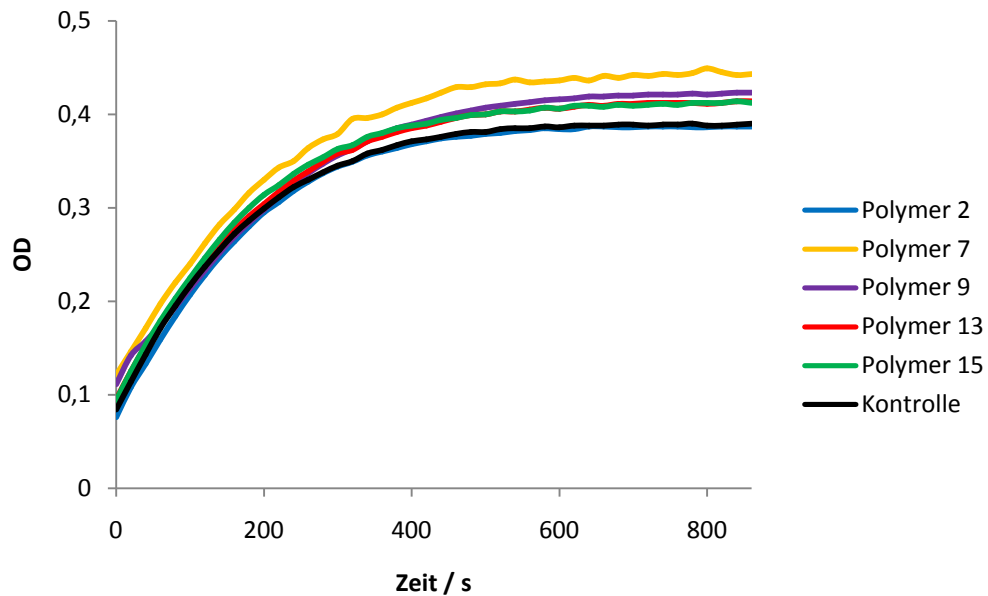


Abb. 5.14: Screening der Polymere **2, 7, 9, 13, 15** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

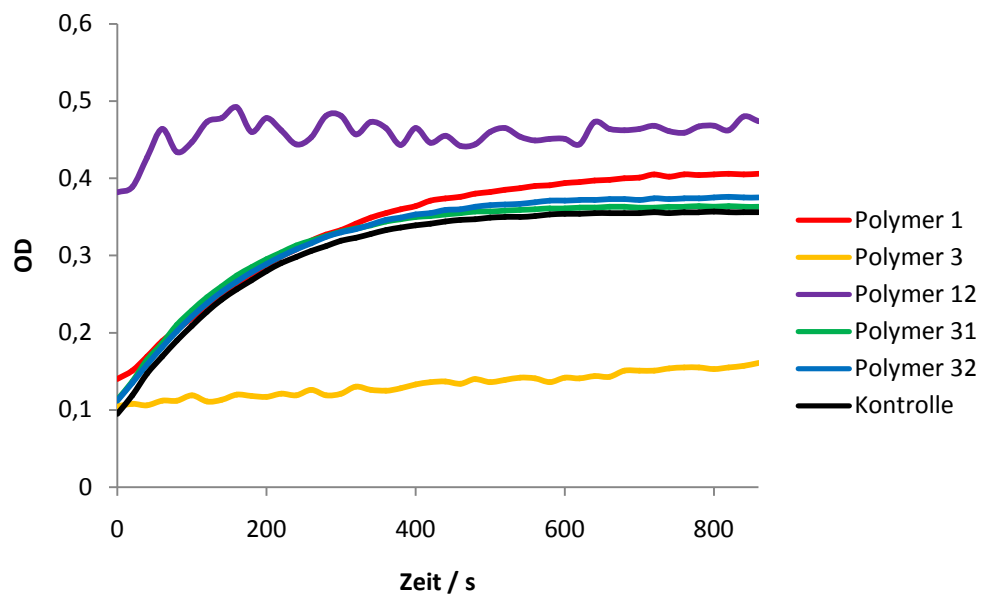


Abb. 5.15: Screening der Polymere **1, 3, 12, 31, 32** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

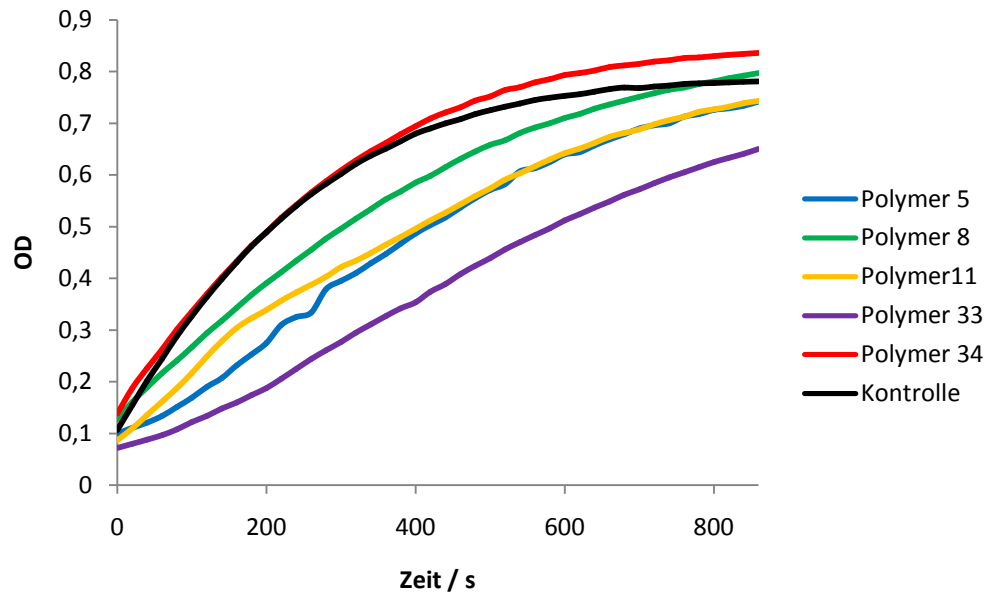


Abb. 5.16: Screening der Polymere **5**, **8**, **11**, **33**, **34** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

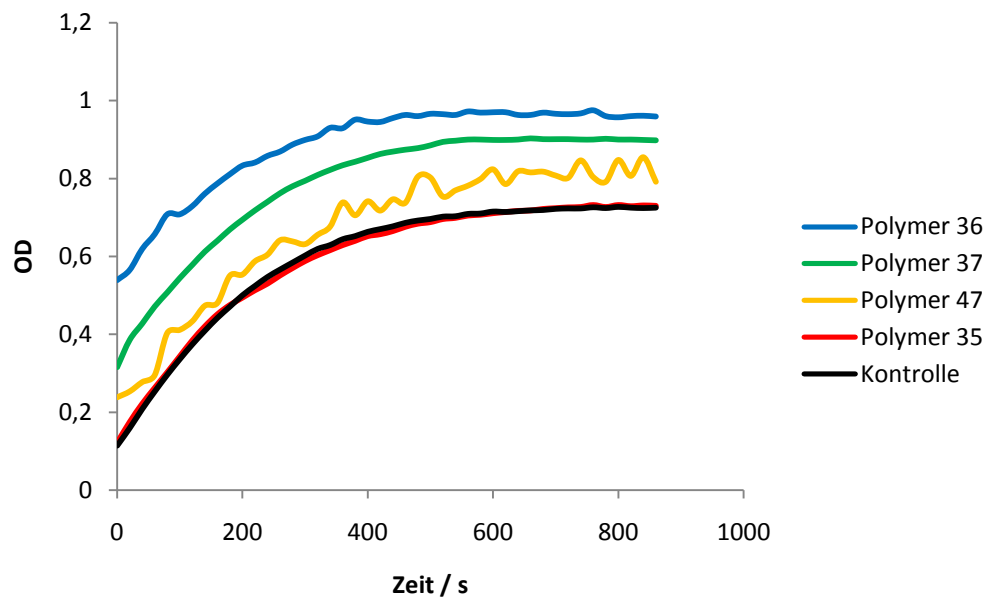


Abb. 5.17: Screening der Polymere **35**, **36**, **37**, **47** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

Die Polymere, die im Screening inhibierende Eigenschaften zeigten, wurden in Verdünnungsreihen mit Trypsin untersucht.

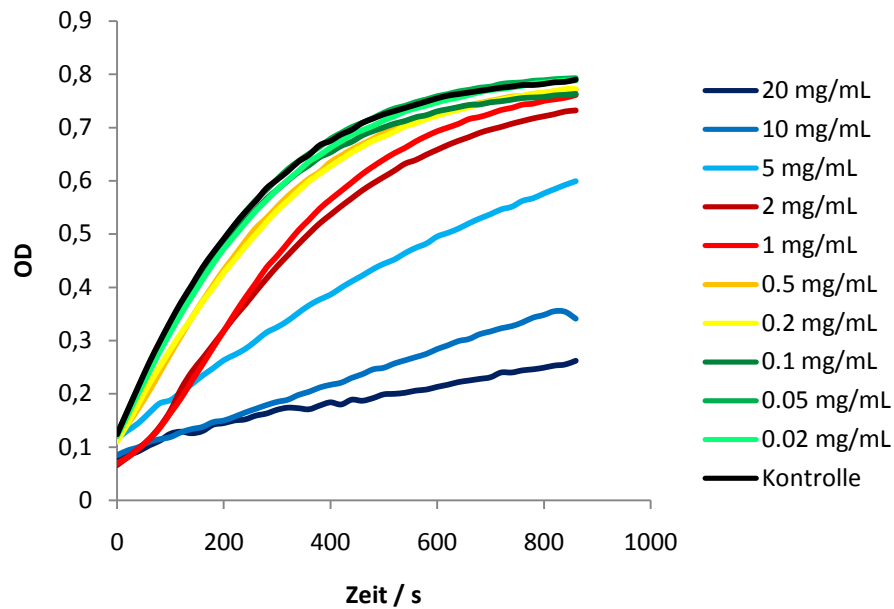


Abb. 5.18: Polymer 3 gegen Trypsin.

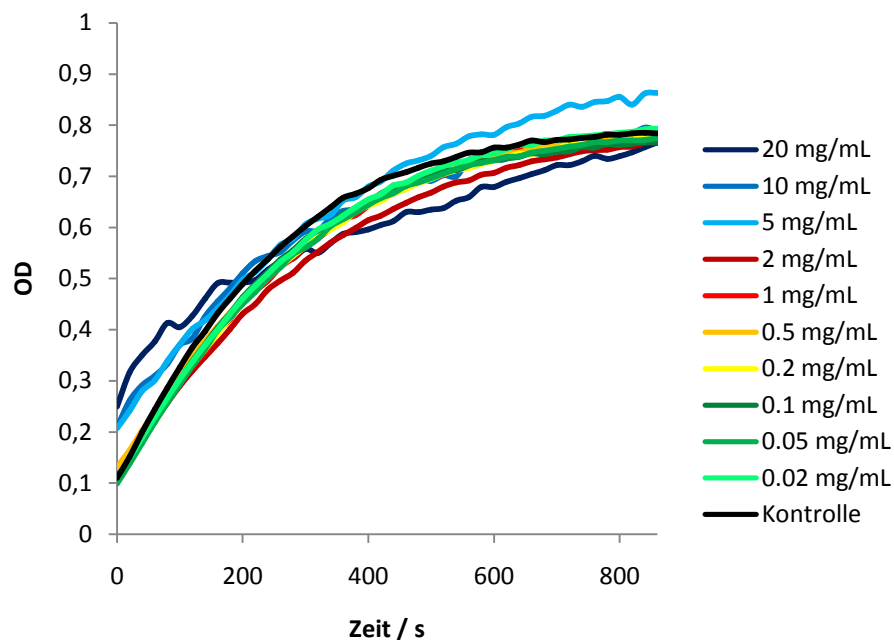


Abb. 5.19: Polymer 12 gegen Trypsin.

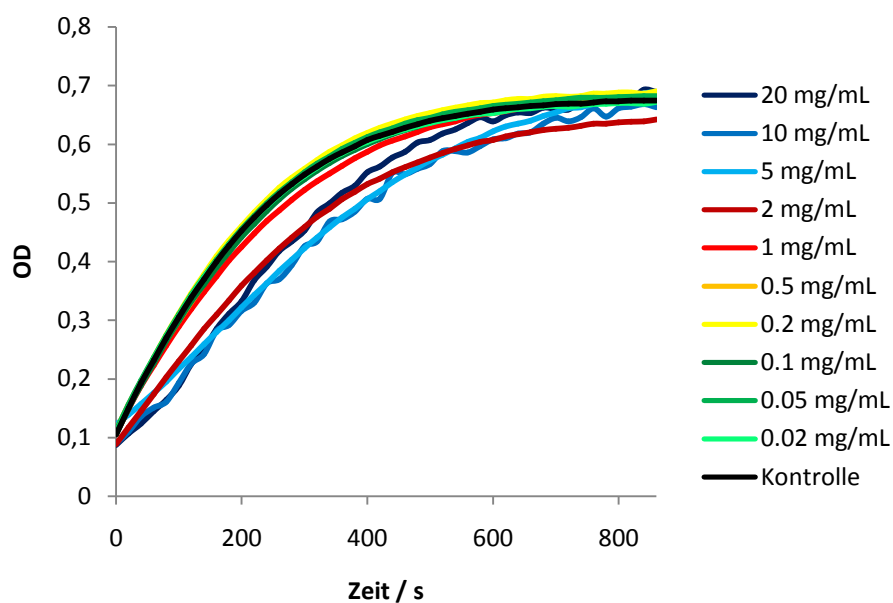


Abb. 5.20: Polymer **5** gegen Trypsin.

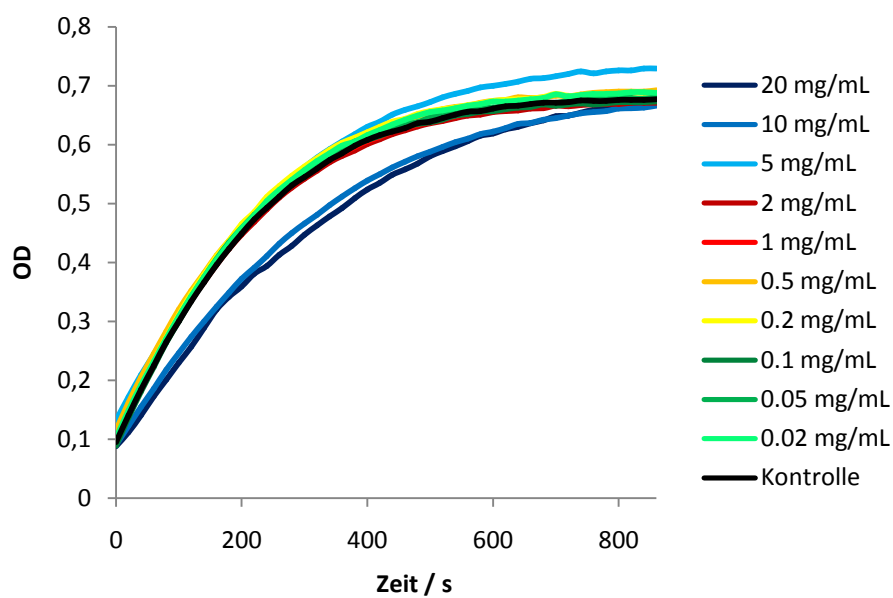
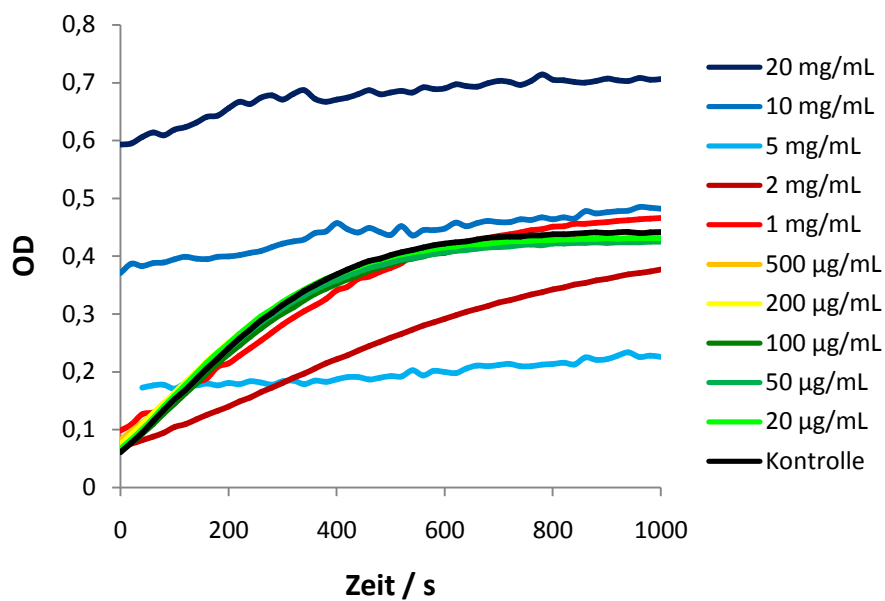
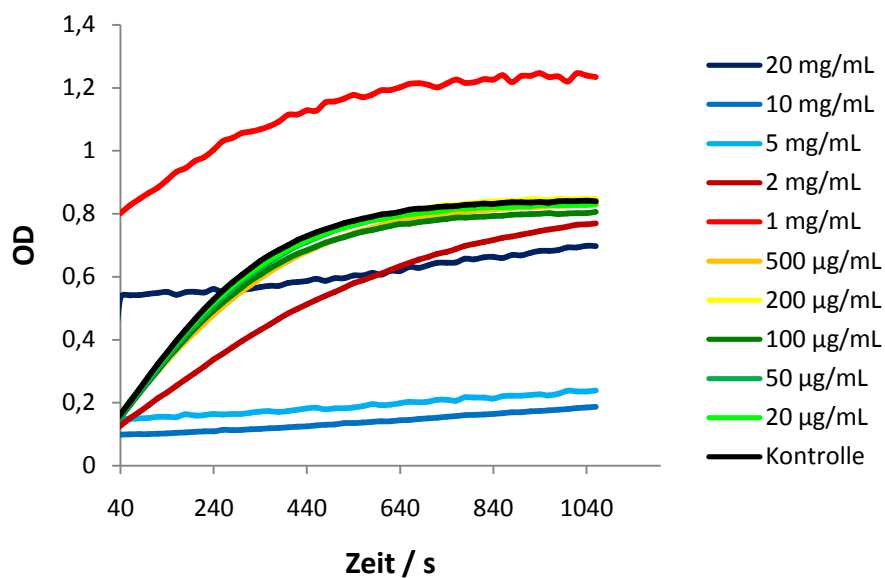


Abb. 5.21: Polymer **33** gegen Trypsin.

Abb. 5.22: Polymer **53** gegen Trypsin.Abb. 5.23: Polymer **56** gegen Trypsin.

Um IC_{50} -Werte zu bestimmen und die Bindungseigenschaften zu quantifizieren, wurden die Anfangsaktivitäten in Abhängigkeit der Polymerkonzentration dargestellt. Zur Ermittlung der Anfangsaktivität wurde jeweils die Steigung der ersten drei Minuten der Kinetik-Messung ermittelt.

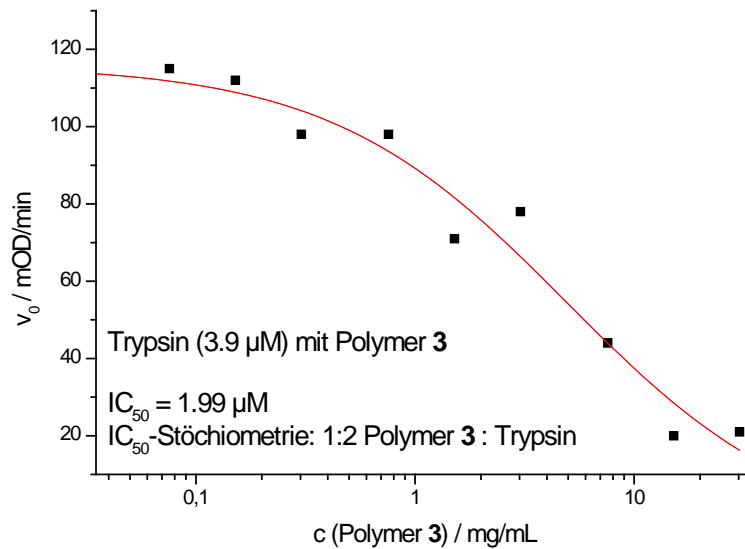


Abb. 5.24: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **3**.

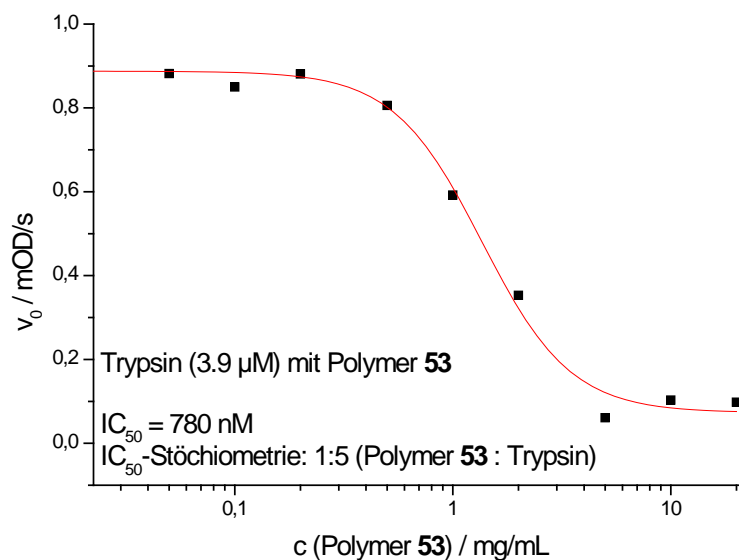
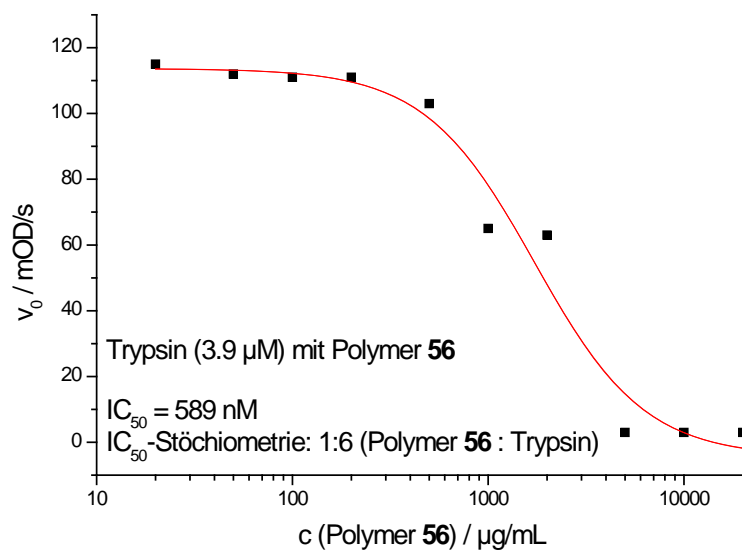


Abb. 5.25: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **53**.

Abb. 5.26: IC_{50} -Kurve: Trypsin mit Polymer **56**.

5.4.3. Cathepsin D

Die Messung der CatD-Aktivität basiert auf der Hydrolyse eines intramolekular gequenchten fluoreszenzaktiven Peptids.

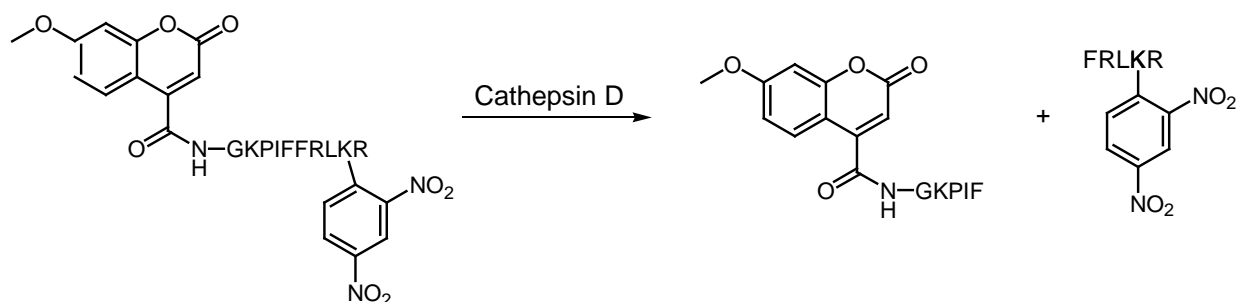


Abb. 5.27: Hydrolytische Spaltung von MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH₂.

Es wurde das Cathepsin D Assay-Kit der Firma Sigma-Aldrich [Product Code CS0800] mit folgenden Lösungen verwendet:

Enzympuffer	975 µL Assaypuffer, 25 µL Albumin-Lösung, pH 4.0
CatD	2.4 mg/L (92 nM) in Enzympuffer
CatD-Substrat	1.756 mg/mL (1 mM) in DMSO

5.4.3.1. Übersichtspektrum

Zur Vermessung eines Fluoreszenzübersichtsspektrums wurden folgende Proben verwendet:

Tab. 5.6: Probenzusammensetzung bei der Messung des Fluoreszenzübersichtsspektrums

	CatD / µL	Assaypuffer / µL	Wasser / µL	Substrat / µL
Substrat	0	20	78	2
Substrat + CatD	5	20	73	2

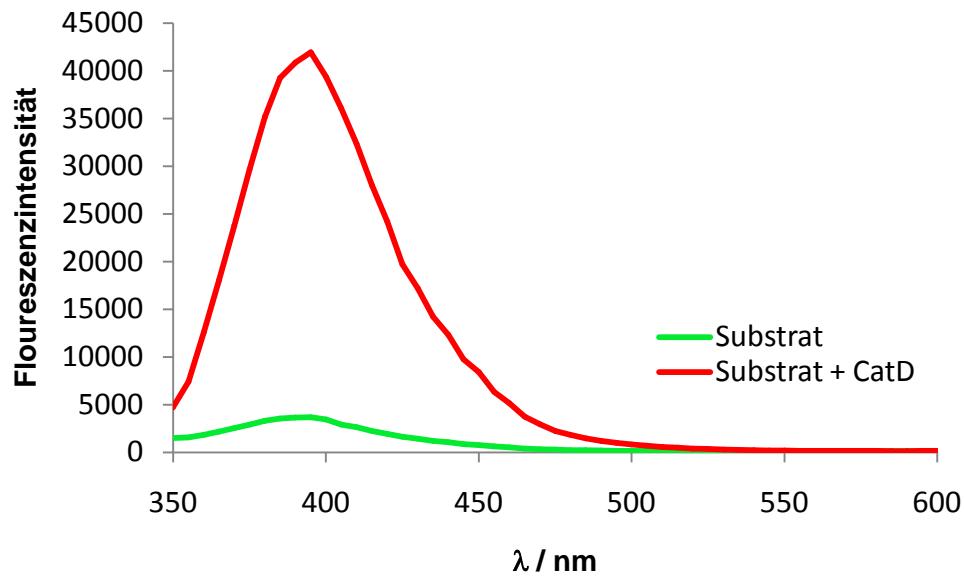


Abb. 5.28: Fluoreszenzspektren des Substrats (grün) und des gespaltenen Substrats (rot) bei einer Anregungswellenlänge von 328 nm.

5.4.3.2. Enzymkinetik

Zur Messung der Enzymaktivität des CatD wurden die oben angegebenen Lösungen verwendet. Das Gesamtprobenvolumen betrug 105 μL .

Tab. 5.7: Probenzusammensetzung des CatD-Enzymassays.

5 μL	CatD
5 μL	Polymer-Lösung (Wasser in den Kontrollansätzen)
20 μL	Assaypuffer
73 μL	Wasser
Inkubation (10 min bei 37°C)	
2 μL	Substrat

Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 328 nm angeregt, die beobachtete Emissionswellenlänge betrug 393 nm. Die Zunahme an fluoreszenzaktivem, gespaltenem Substrat wurde über 30 min alle 30 s gemessen, vor jeder Messung wurde die Probe 4 s geschüttelt.

Das Screening der Polymere erfolgte mit Polymerstammlösungen der Konzentration 500 µg/mL.

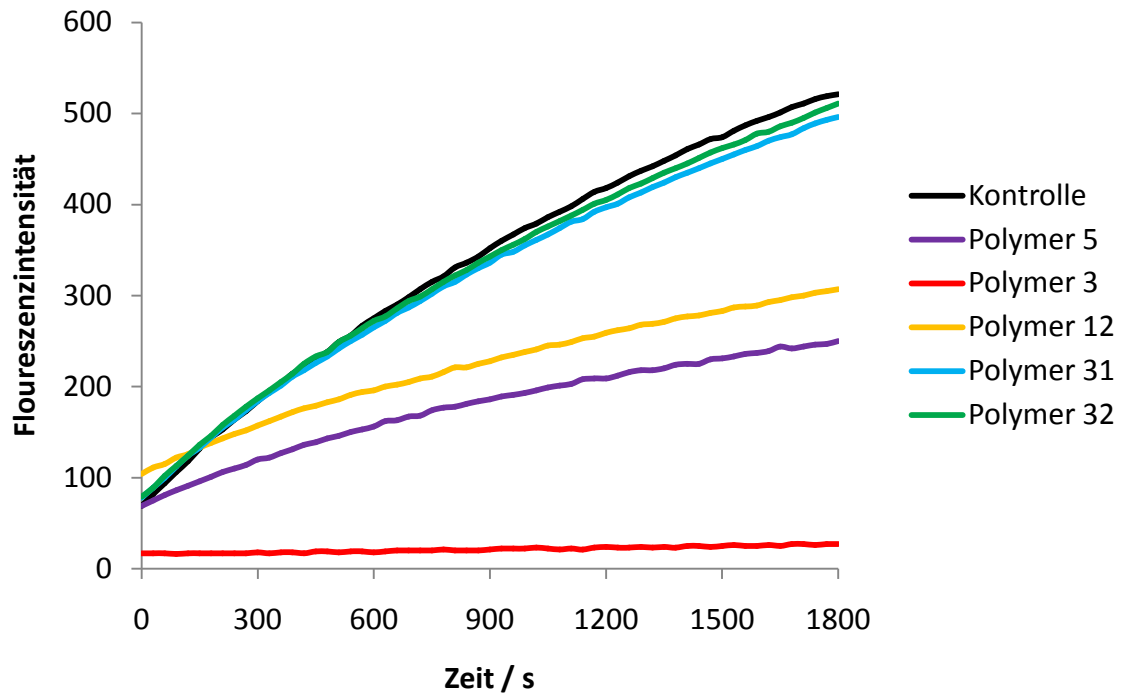


Abb. 5.29: Screening der Polymere **3**, **5**, **12**, **31** und **32** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

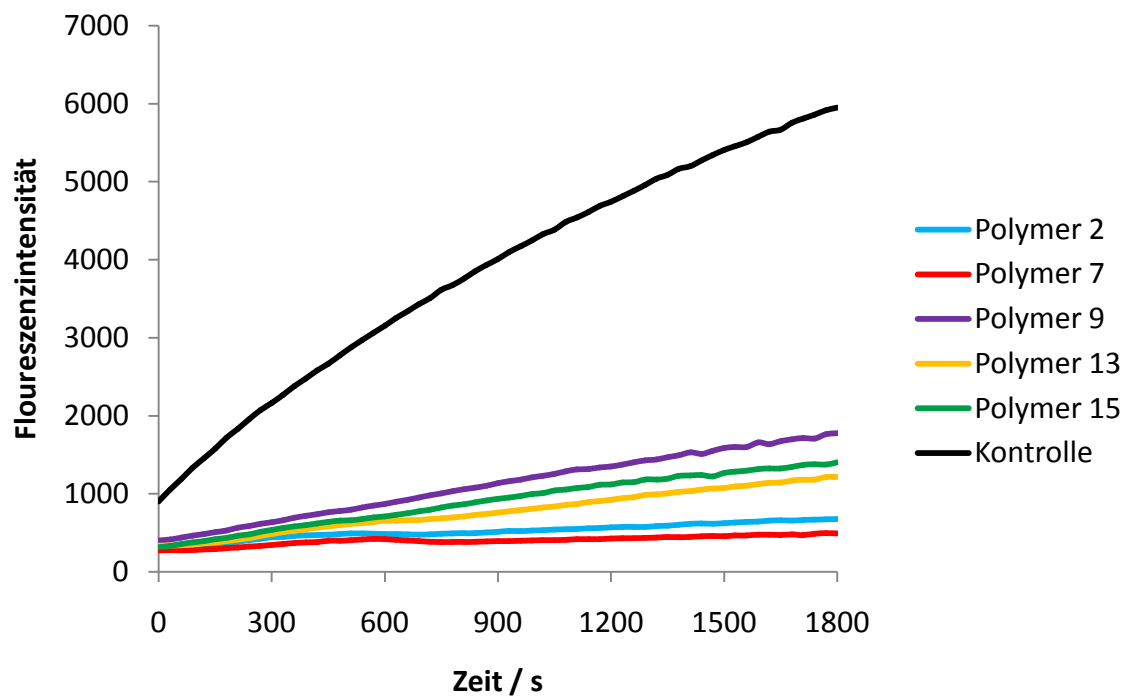


Abb. 5.30: Screening der Polymere **2**, **7**, **9**, **13** und **15** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

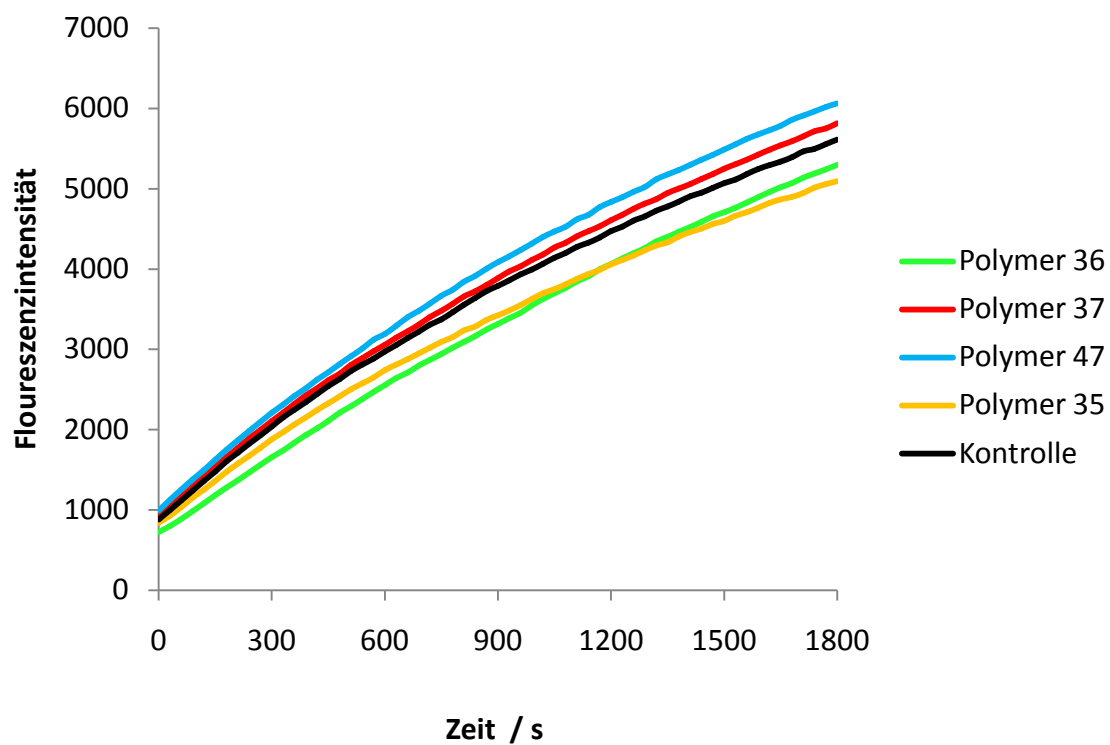


Abb. 5.31: Screening der Polymere **35**, **36**, **37** und **47** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

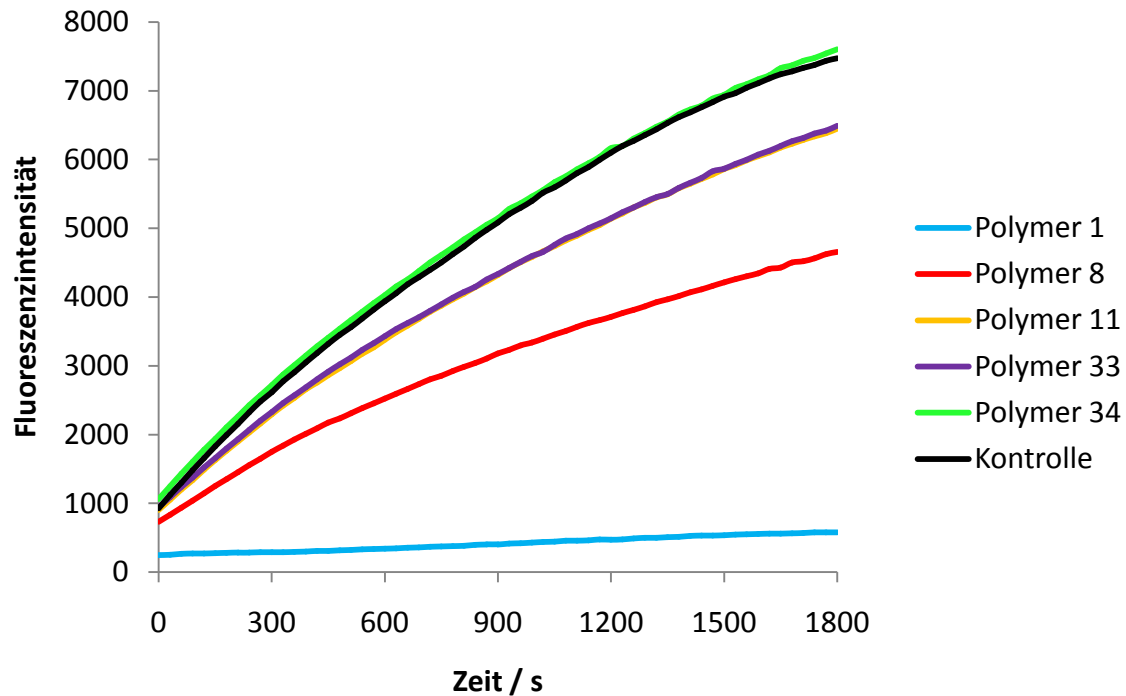


Abb. 5.32: Screening der Polymere **1**, **8**, **11**, **33** und **34** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

Die Polymere, die im Screening gute inhibierende Eigenschaften zeigten, wurden in Verdünnungsreihen mit CatD untersucht.

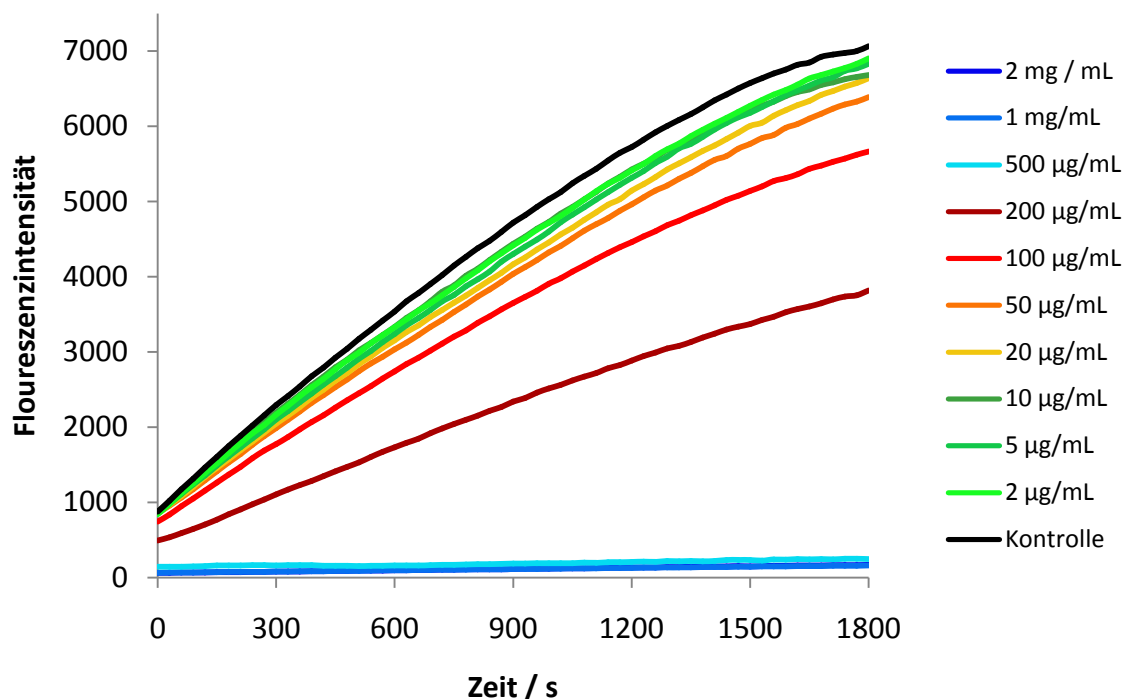


Abb. 5.33: Polymer 1 gegen CatD.

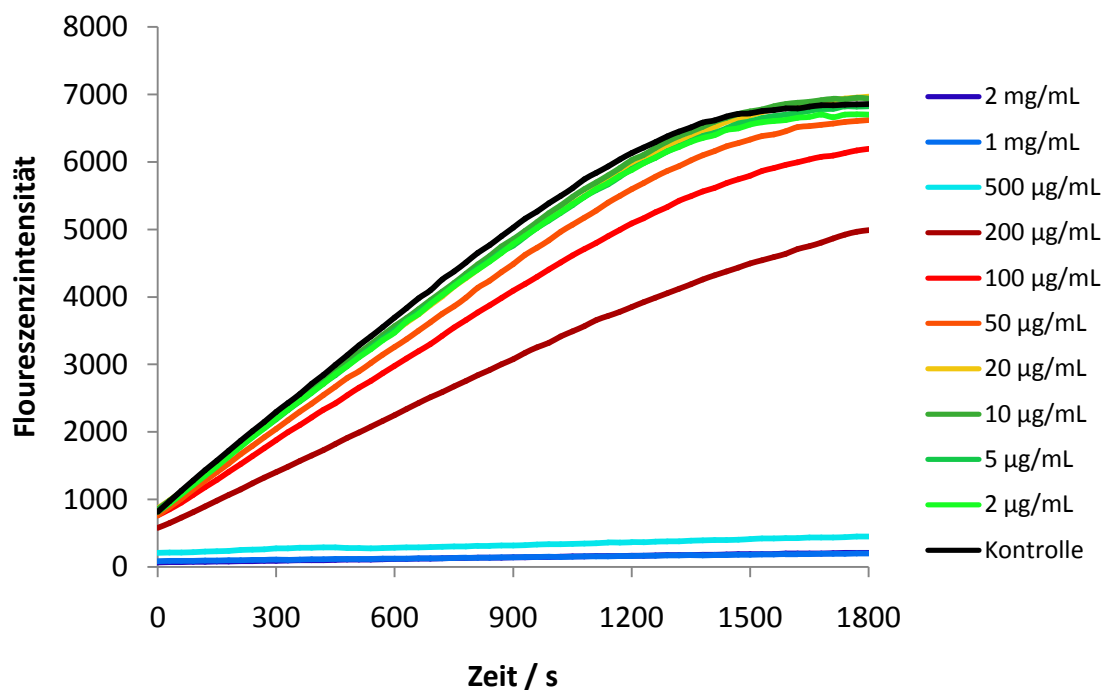


Abb. 5.34: Polymer 2 gegen CatD.

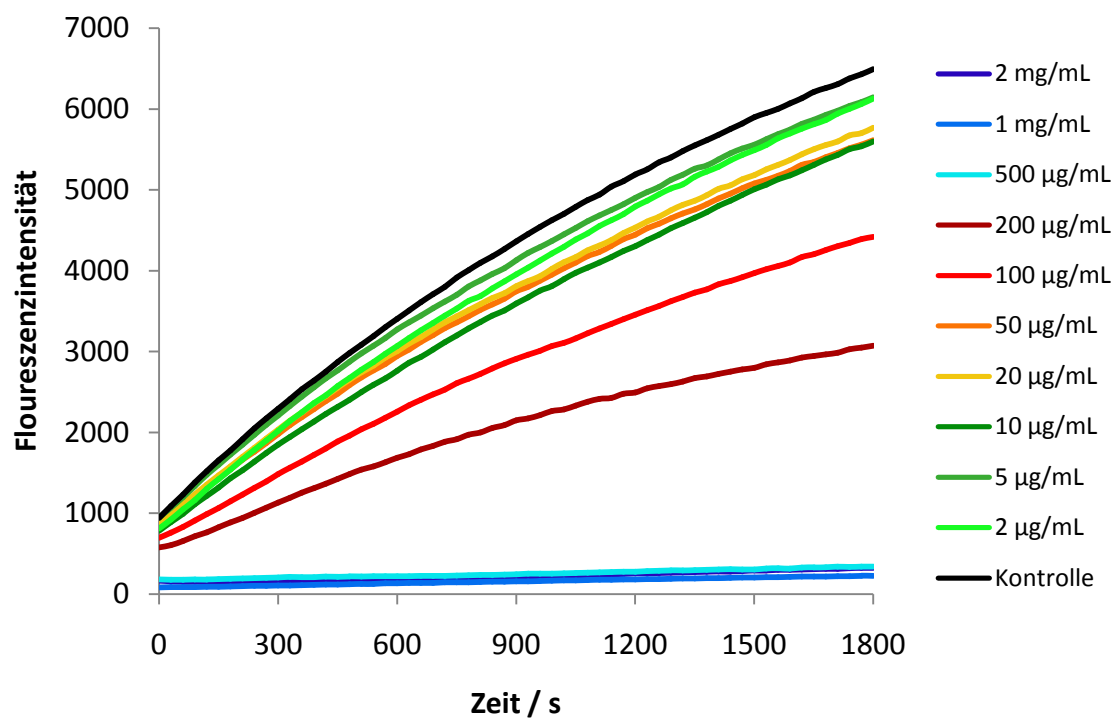


Abb. 5.35: Polymer 3 gegen CatD.

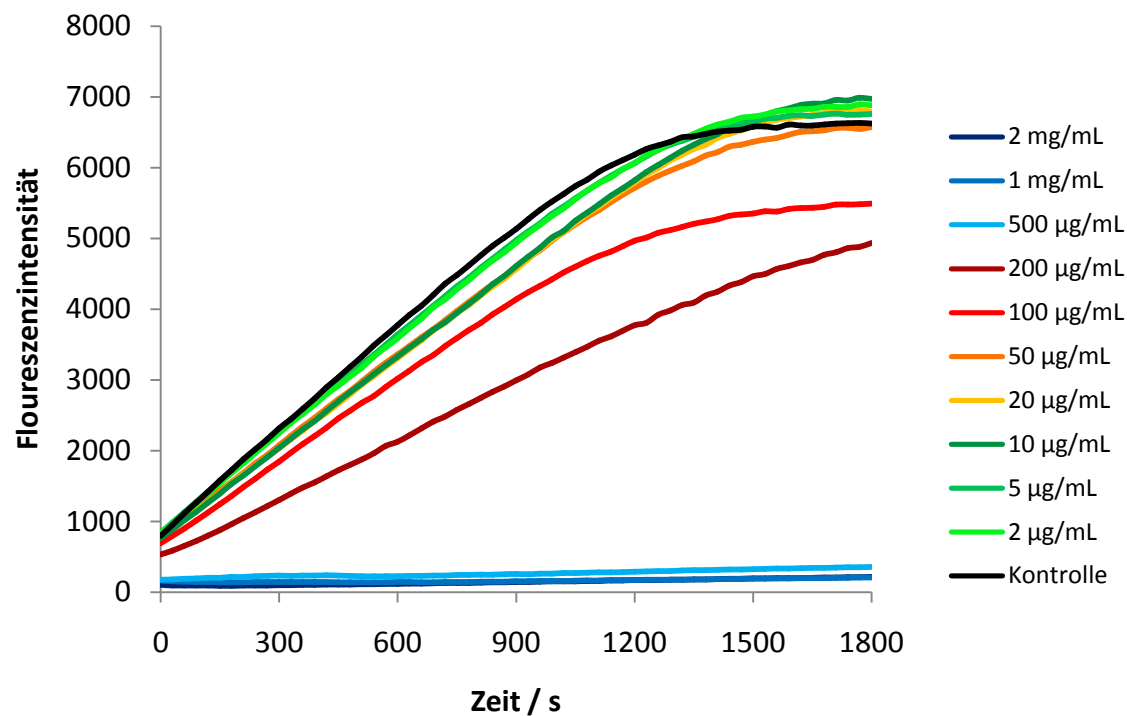


Abb. 5.36: Polymer 7 gegen CatD.

Um die Effektivität der Inhibierung zu erhöhen, wurden substranmimetische Monomere in die inhibierenden Polymere einpolymerisiert und diese ebenfalls in Verdünnungsreihen auf ihre inhibitorischen Eigenschaften getestet.

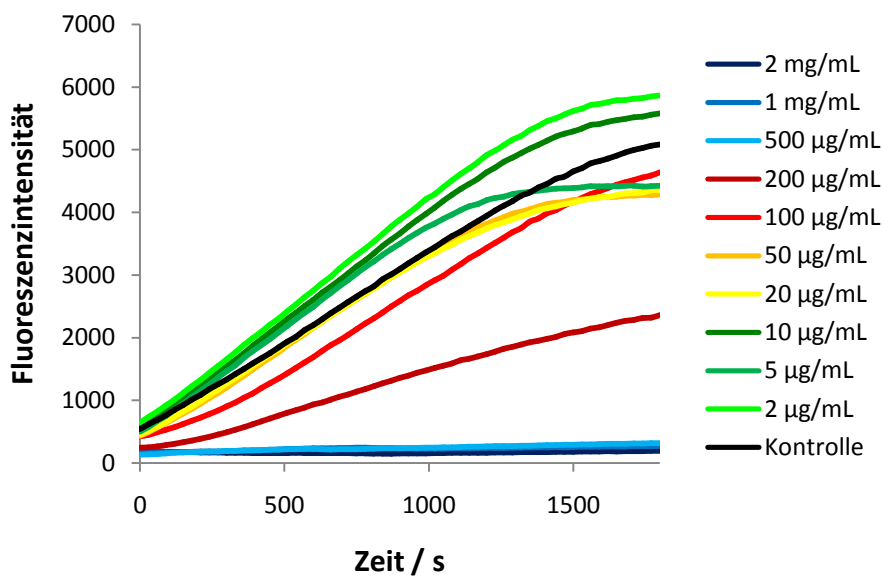


Abb. 5.37: Polymer **52** gegen CatD.

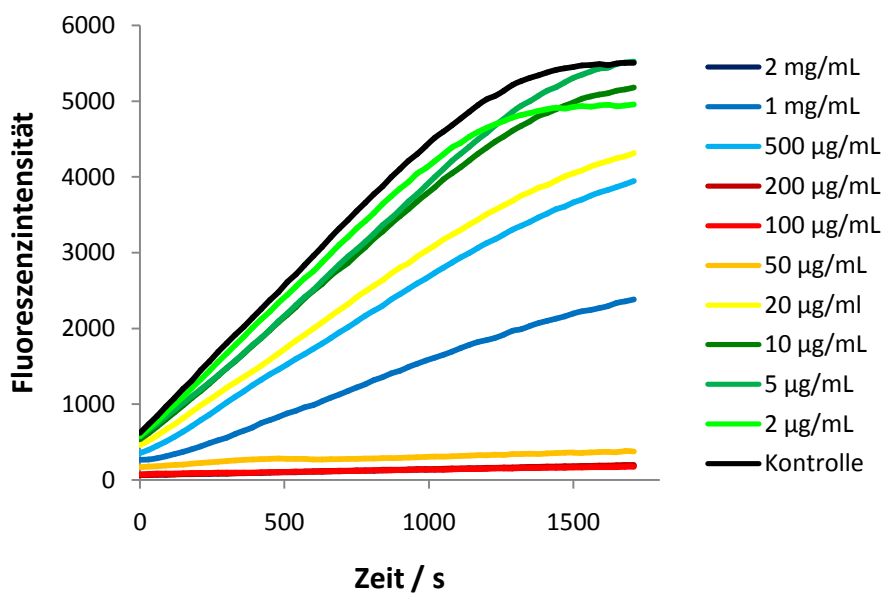
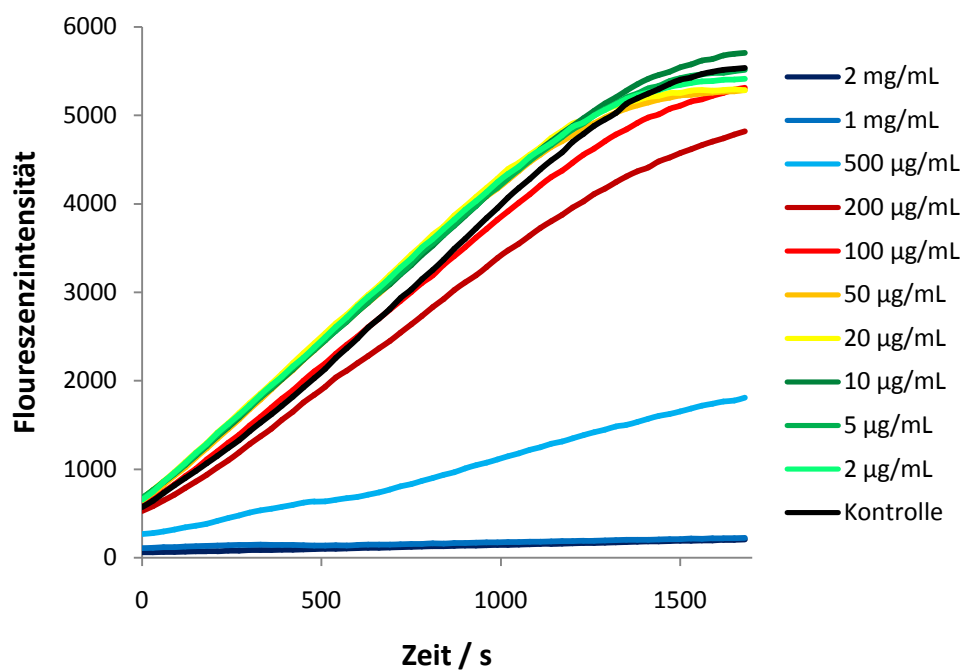
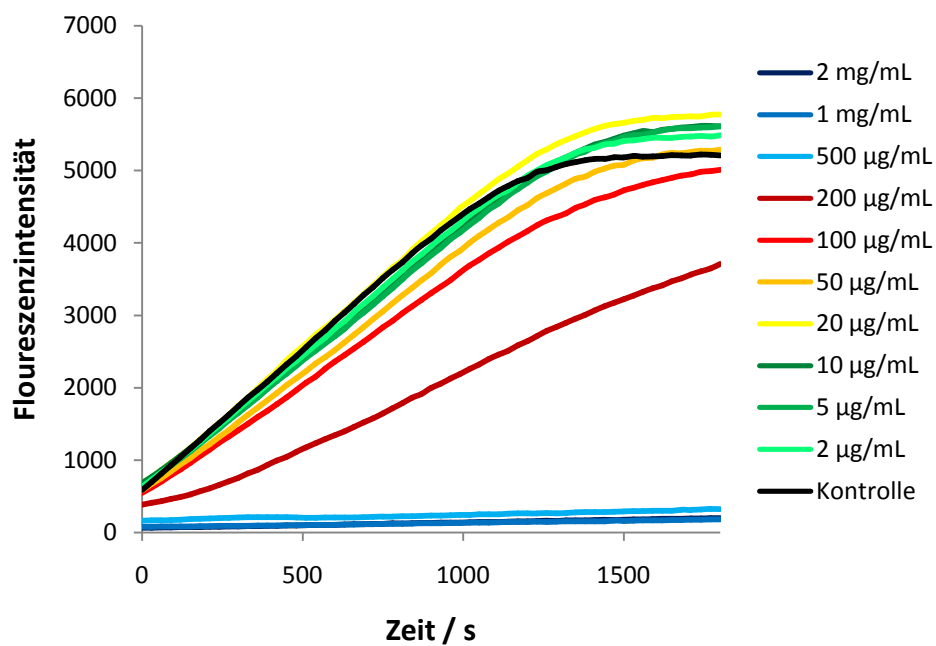


Abb. 5.38: Polymer **53** gegen CatD.

Abb. 5.39: Polymer **55** gegen CatD.Abb. 5.40: Polymer **56** gegen CatD.

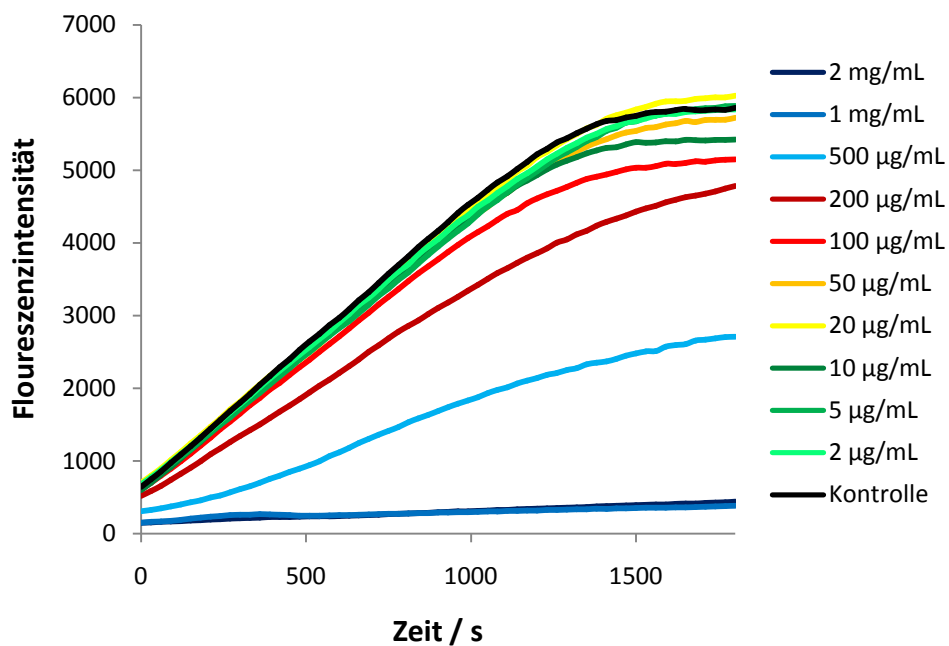


Abb. 5.41: Polymer **57** gegen CatD.

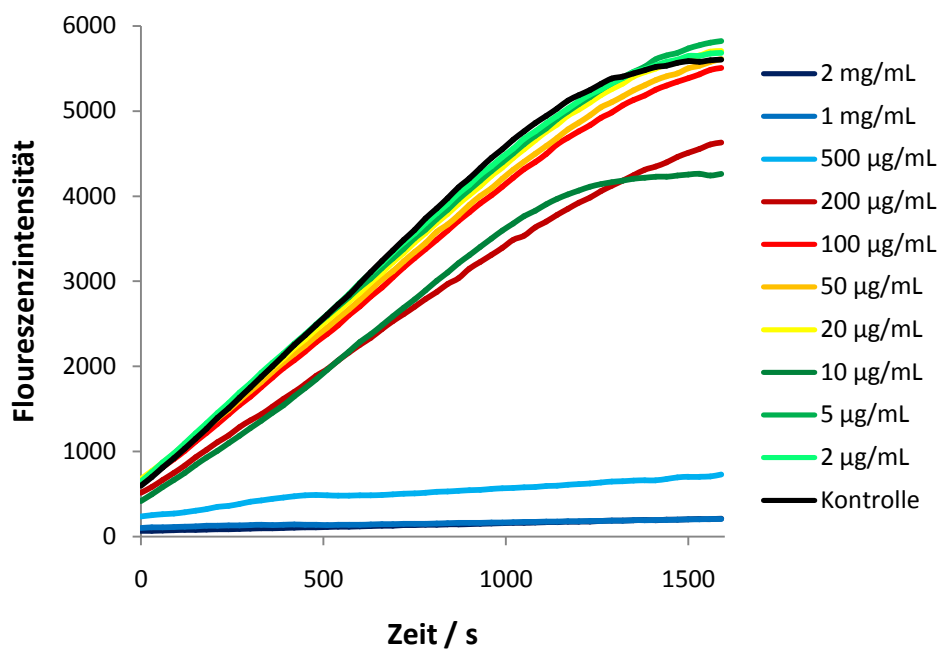
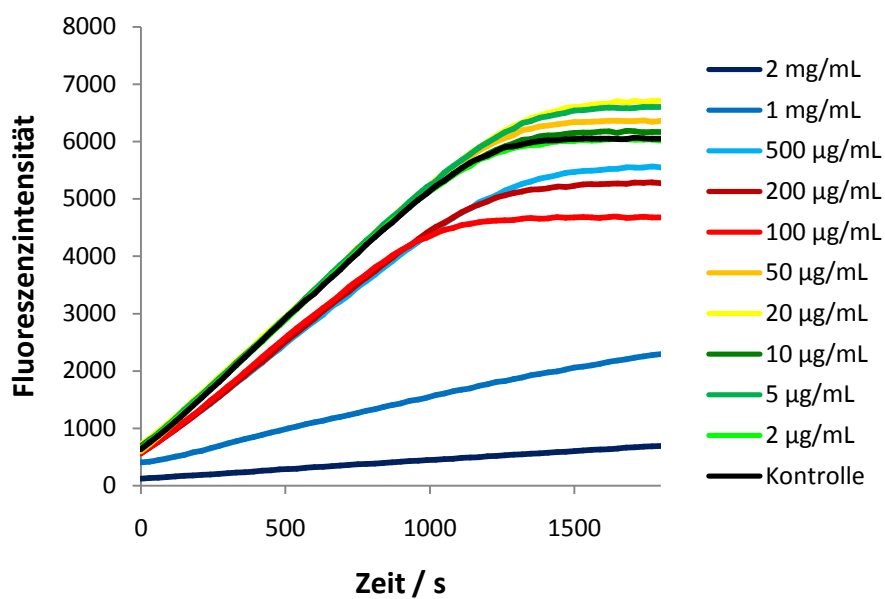
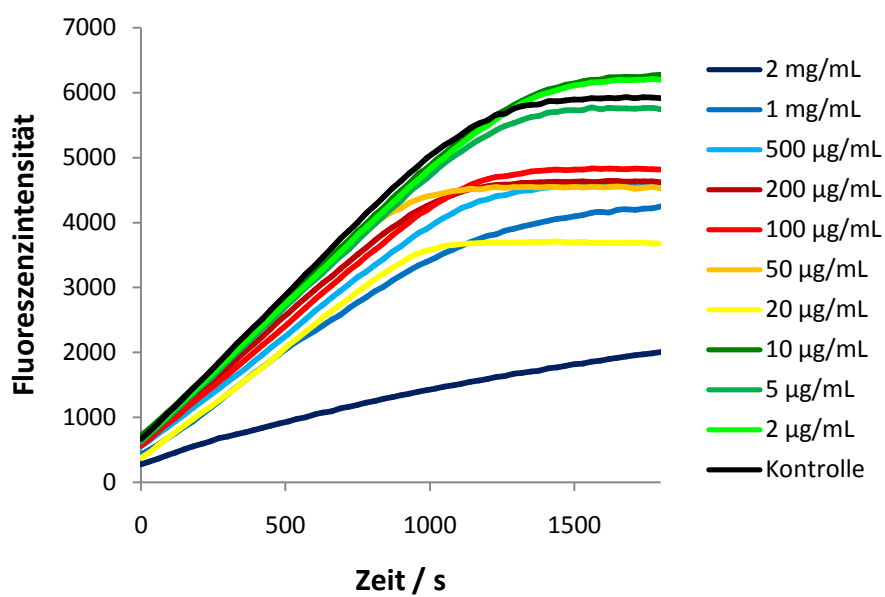


Abb. 5.42: Polymer **58** gegen CatD.

Abb. 5.43: Polymer **60** gegen CatD.Abb. 5.44: Polymer **62** gegen CatD.

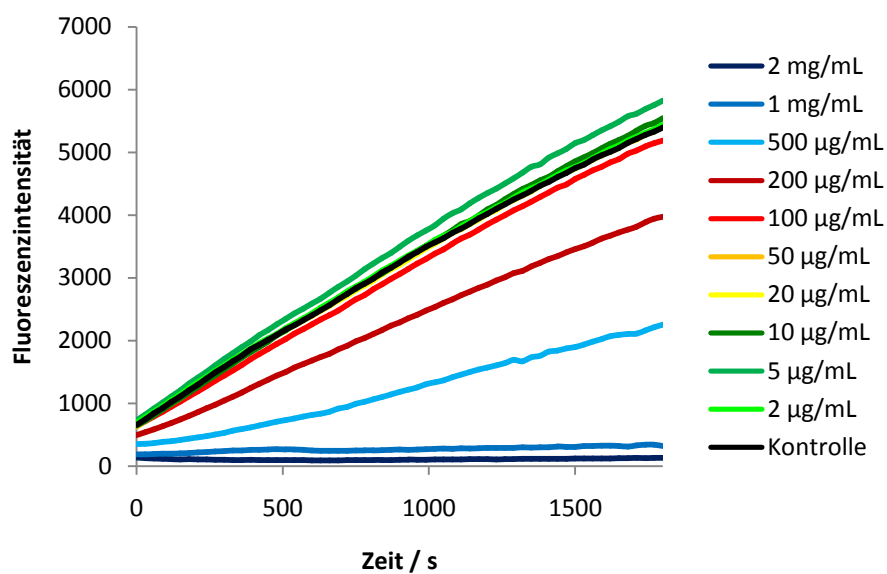


Abb. 5.45: Polymer **63** gegen CatD.

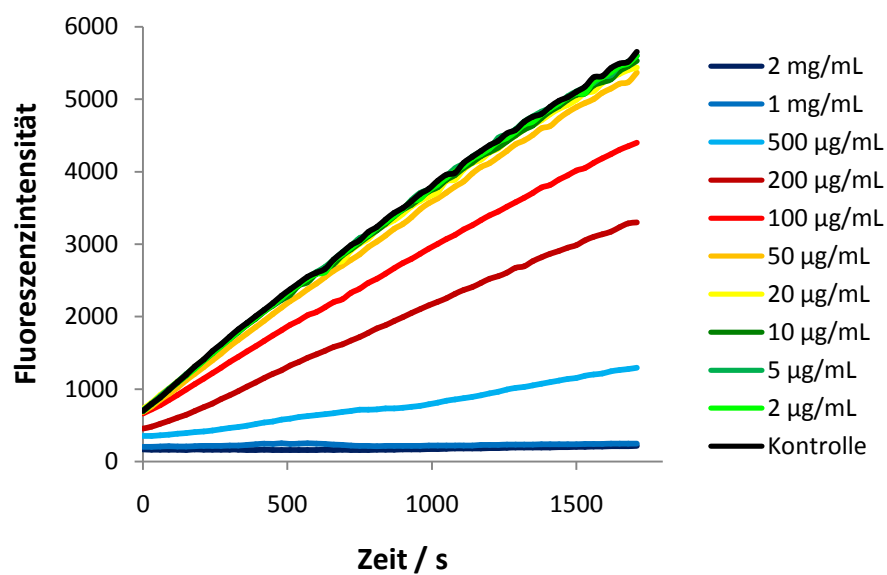


Abb. 5.46: Polymer **64** gegen CatD.

Um IC_{50} -Werte zu bestimmen und die Bindungseigenschaften zu quantifizieren, wurden die Anfangsaktivitäten in Abhängigkeit der Polymerkonzentration dargestellt. Zur Ermittlung der Anfangsaktivität wurde jeweils die Steigung der ersten drei Minuten der Kinetik-Messung ermittelt.

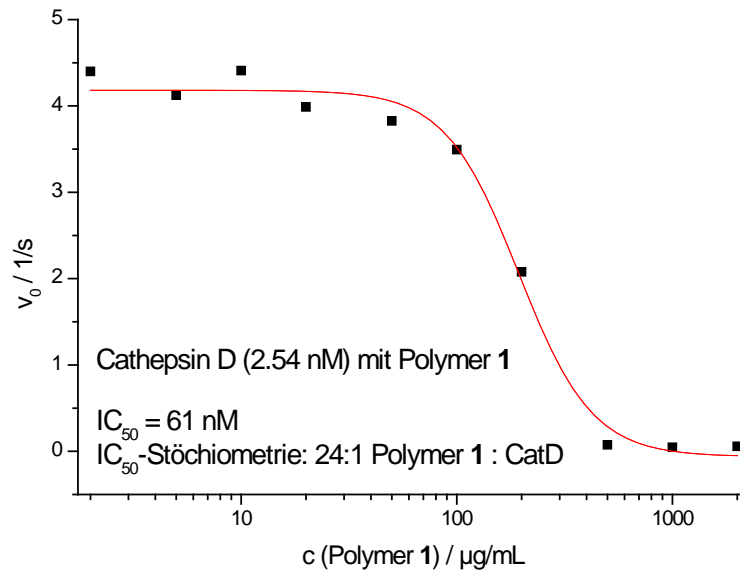


Abb. 5.47: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer 1.

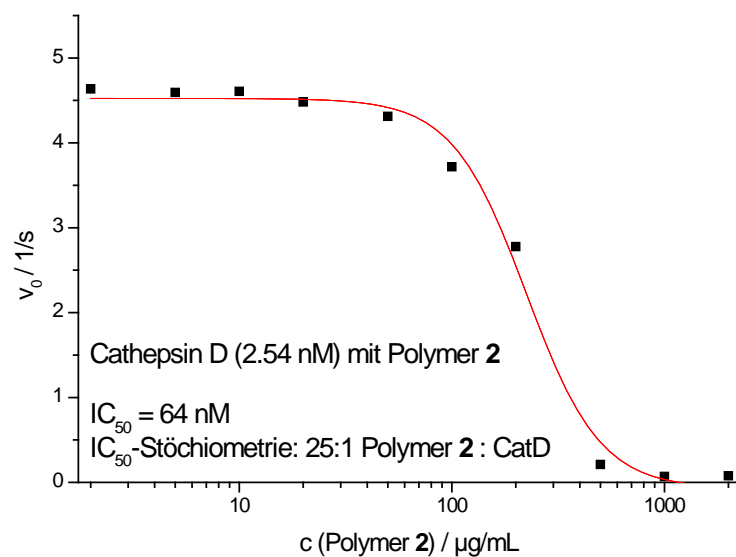


Abb. 5.48: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer 2.

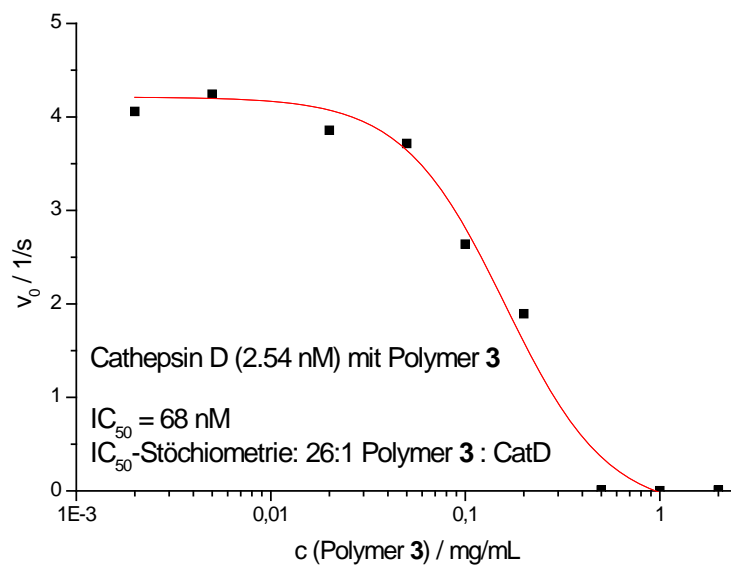


Abb. 5.49: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer 3.

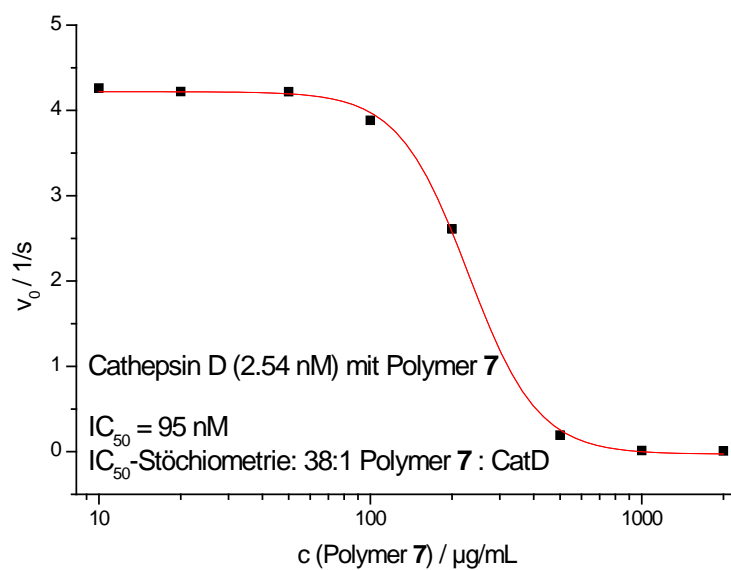
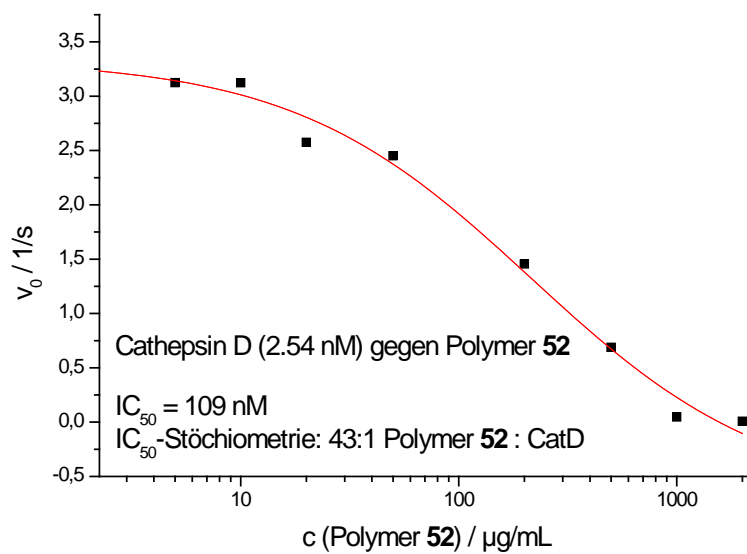
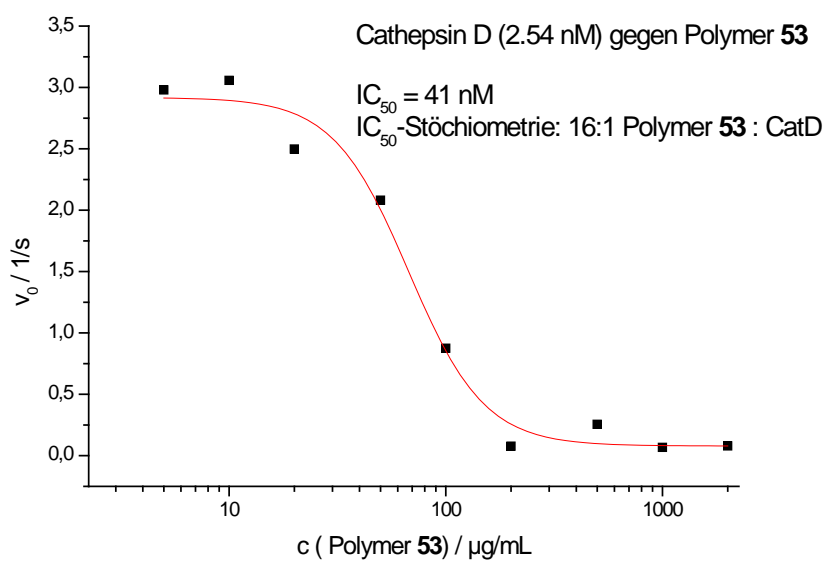


Abb. 5.50: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer 7.

Abb. 5.51: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **52**.Abb. 5.52: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **53**.

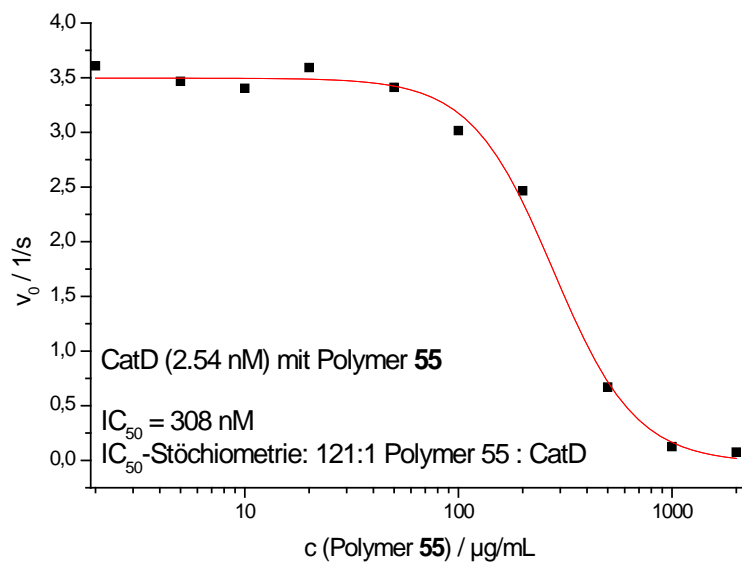


Abb. 5.53: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **55**.

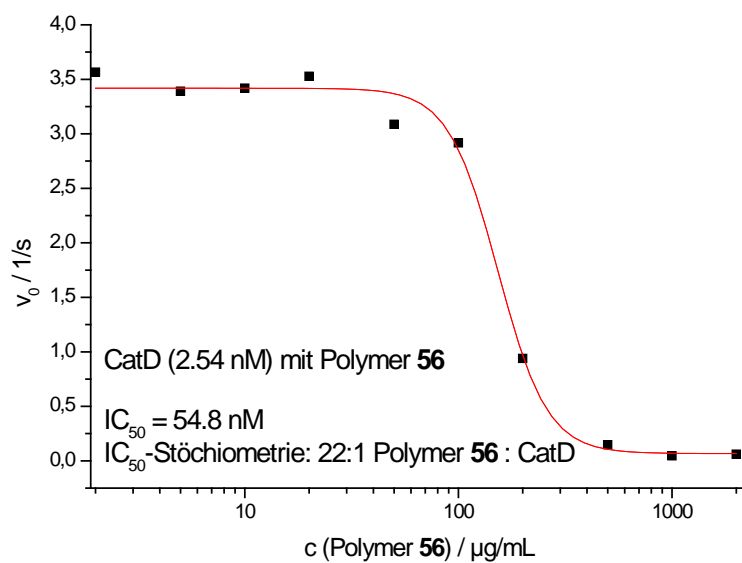
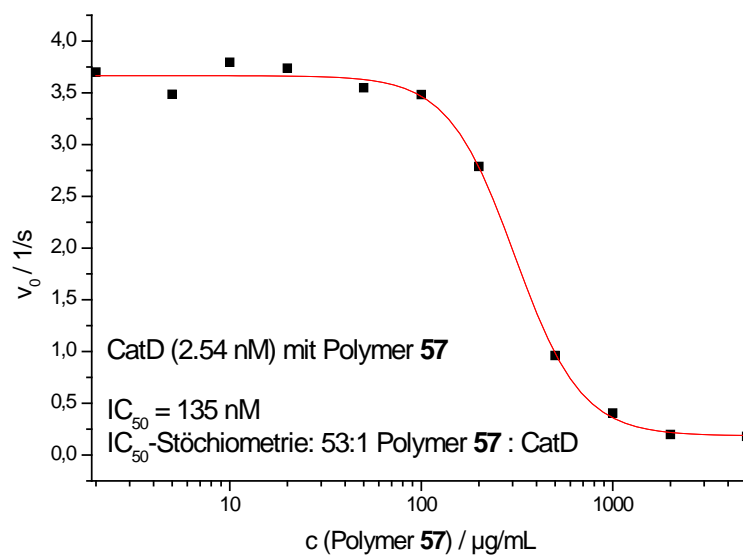
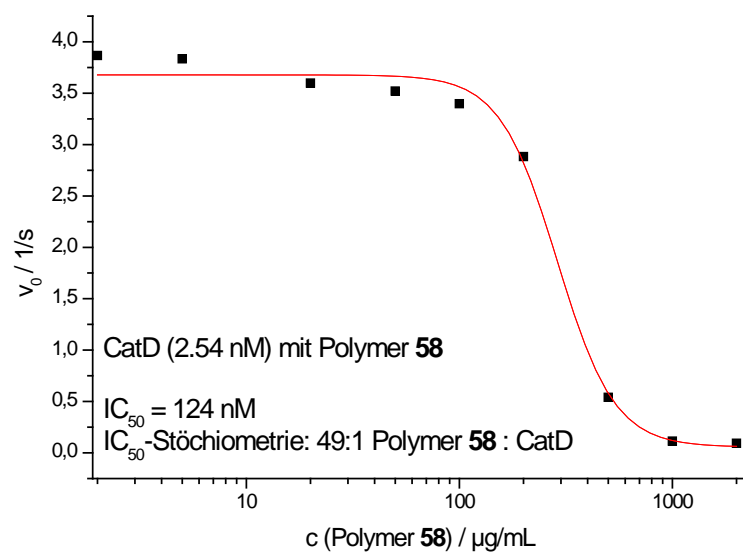


Abb. 5.54: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **56**.

Abb. 5.55: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **57**.Abb. 5.56: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **58**.

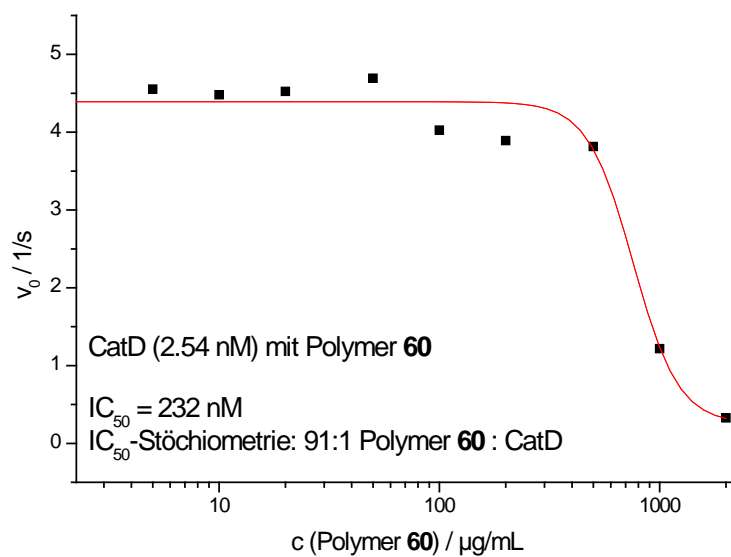


Abb. 5.57: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **60**.

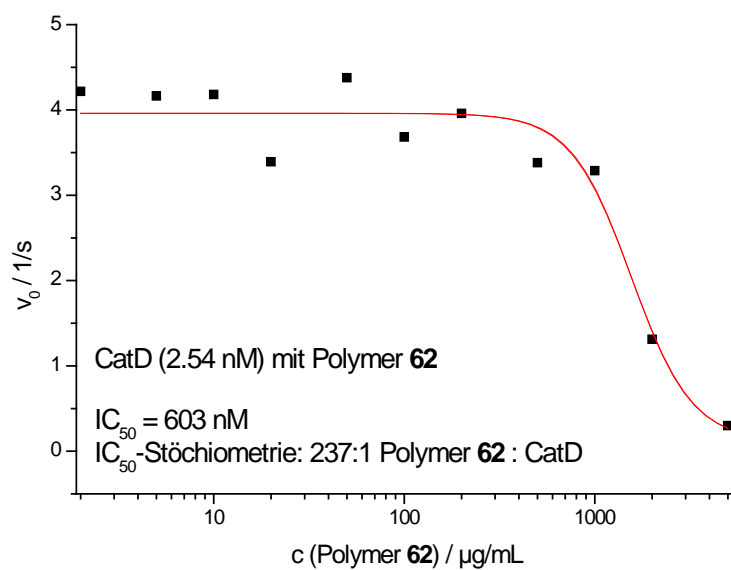
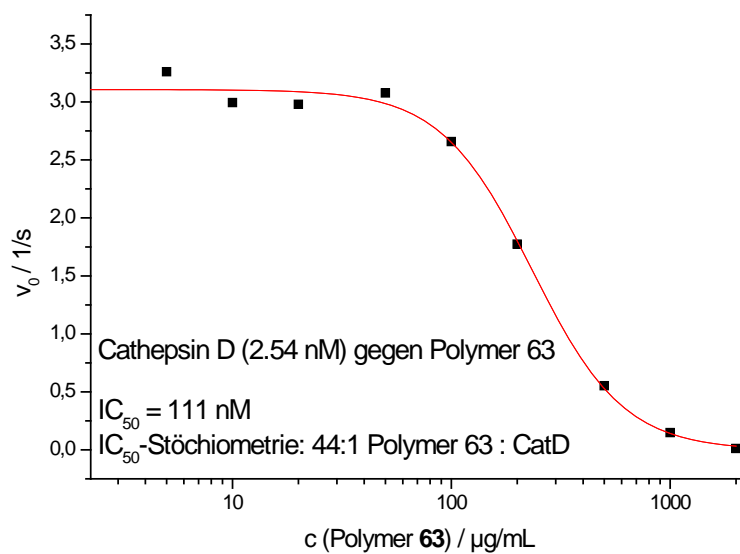
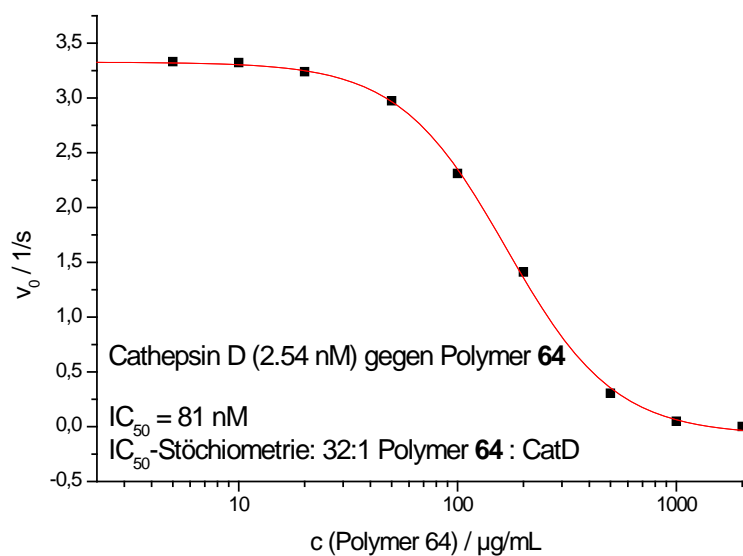


Abb. 5.58: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **62**.

Abb. 5.59: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **63**.Abb. 5.60: IC_{50} -Kurve: CatD mit Polymer **64**.

5.4.4. Pankreaslipase

Zur Messung der Pankreaslipaseaktivität wird die Hydrolyse des Substrats, *p*-nitrophenylpalmitat, und die damit verbundene Freisetzung von *p*-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt.

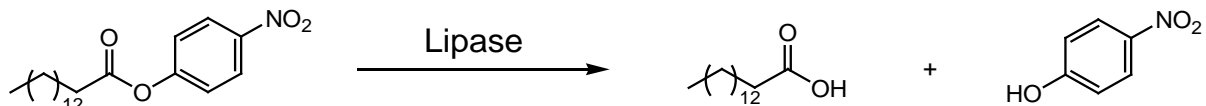


Abb. 5.61: Hydrolytische Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat durch Lipase.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Puffer 50 mM Phosphat, pH 8.0

Lipase 500 µg/mL in 1 % NaCl

Substrat 18.6 mg Natriumdeoxycholat, 2.25 mg Gummi arabisch in 4.5 mL Puffer, 1.5 mg in 500 µL Isopropanol gelöst zugegen, 1 h im Eisbad rühren

5.4.5.1. Übersichtsspektrum

Zur Vermessung eines UV-Übersichtsspektrums wurden folgende Proben verwendet:

Tab. 5.8: Probenzusammensetzung bei der Messung des UV-Übersichtsspektrums

	Lipase / µL	Substrat / µL
Substrat	0	100
Substrat + Lipase	10	100

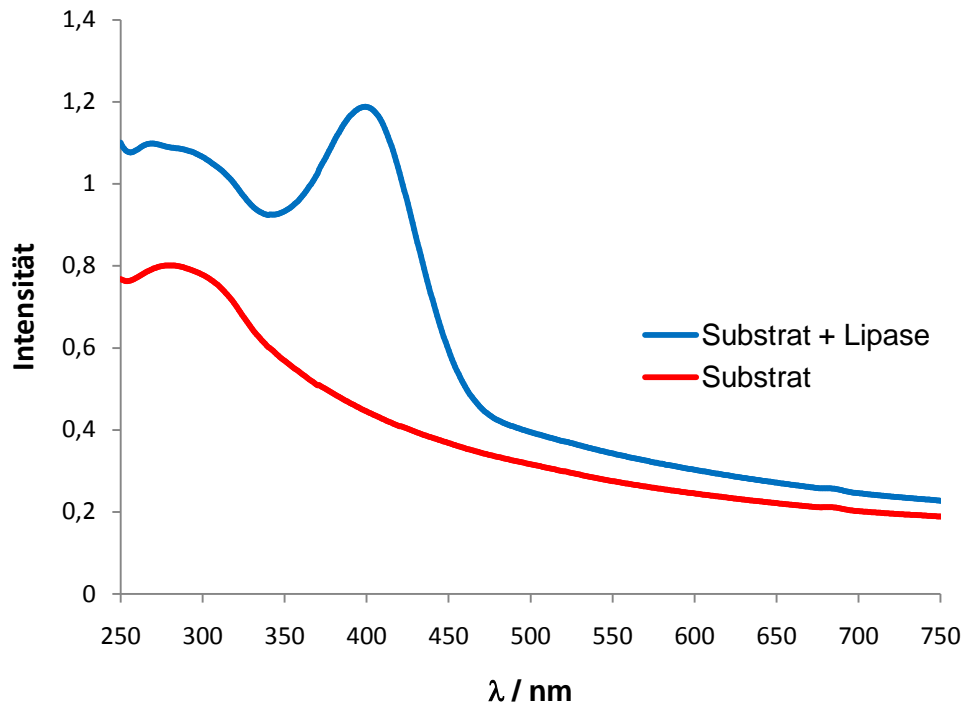


Abb. 5.62: UV-Übersichtsspektrum des Substrats (rot) und des gespaltenen Substrats (blau).

5.4.5.2. Enzymkinetik

Zur Messung der Enzymaktivität der Lipase wurden die oben angegebenen Lösungen verwendet. Das Gesamtprobenvolumen betrug 110 μL .

Tab. 5.9: Probenzusammensetzung des Lipase-Enzymassays.

5 μL	Lipase
5 μL	Polymer-Lösung (Wasser in den Kontrollansätzen)
Inkubation (2 h bei 25°C)	
100 μL	Substrat

Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Zunahme an freiem *p*-Nitrophenol wurde über 30 min alle 20 s gemessen, vor jeder Messung wurde die Probe 4 s geschüttelt.

Im Screening wurden die Polymere auf ihre inhibitorischen Eigenschaften getestet. Es wurden Polymerlösungen mit einer Konzentration von 20 mg/mL verwendet.

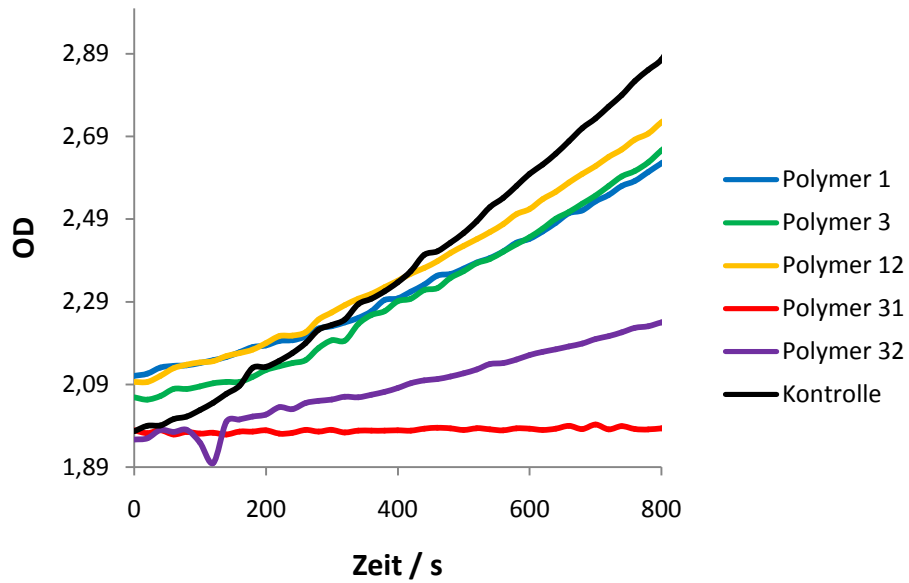


Abb. 5.63: Screening der Polymere **1**, **3**, **12**, **31** und **32** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

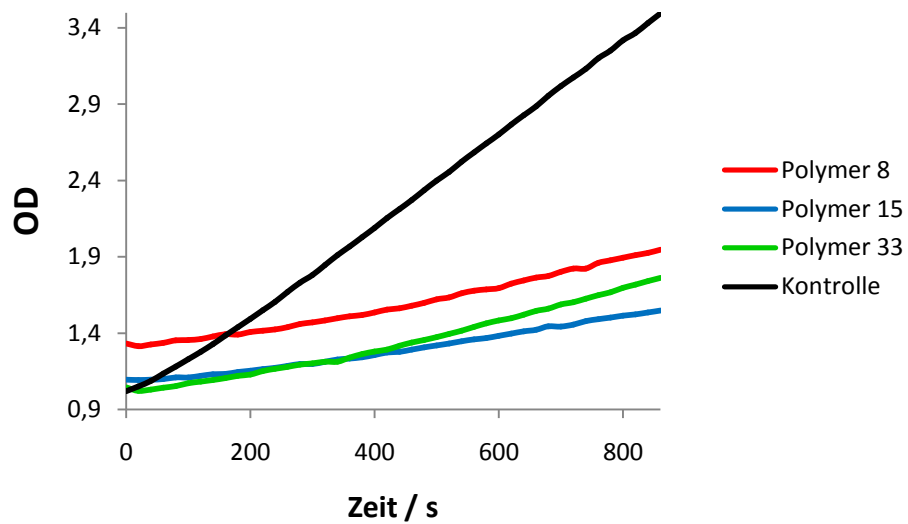


Abb. 5.64: Screening der Polymere **8**, **15** und **33** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

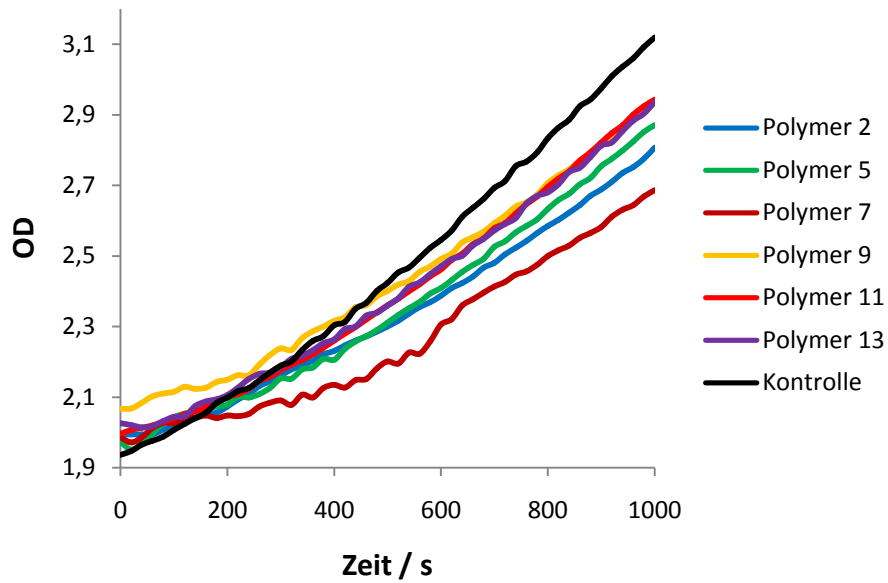


Abb. 5.65: Screening der Polymere **2**, **5**, **7**, **9**, **11** und **13** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

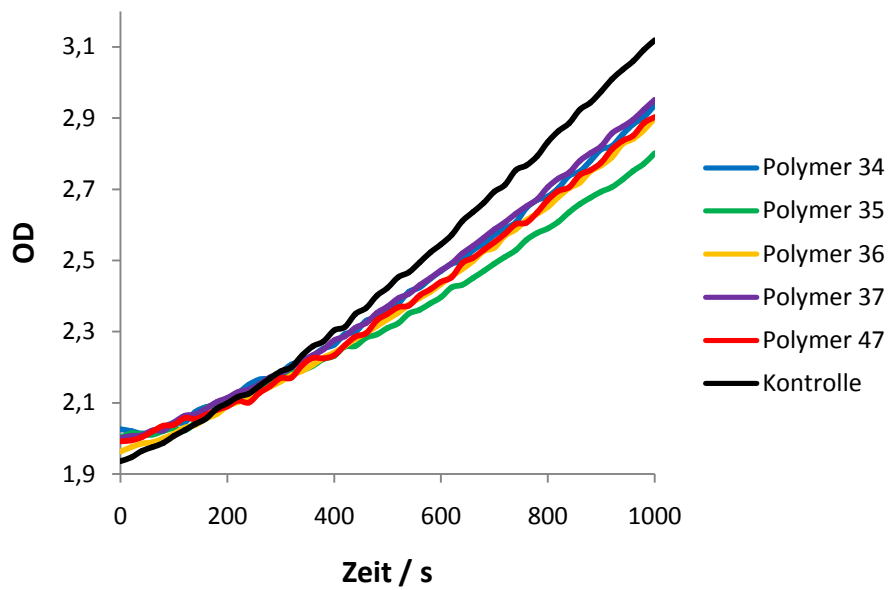


Abb. 5.66: Screening der Polymere **34**, **35**, **36**, **37** und **47** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

IC₅₀-Werte wurden mit den Polymeren **31** und **48** bestimmt.

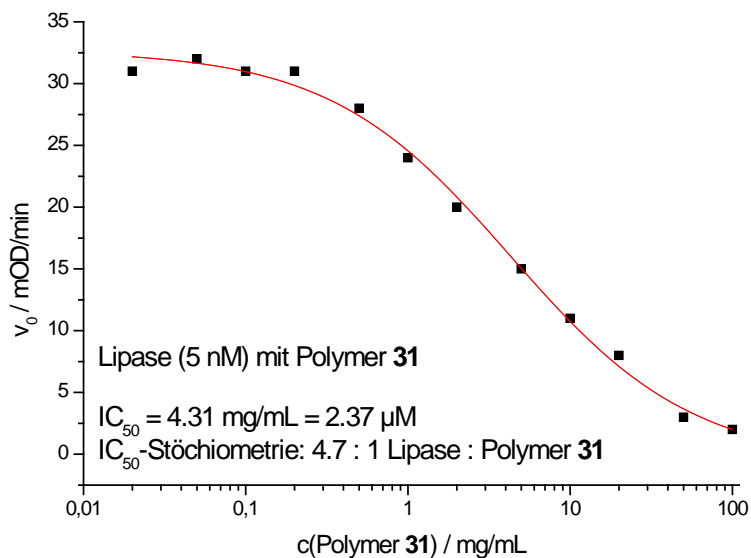


Abb. 5.57: IC₅₀-Kurve: Lipase mit Polymer **31**.

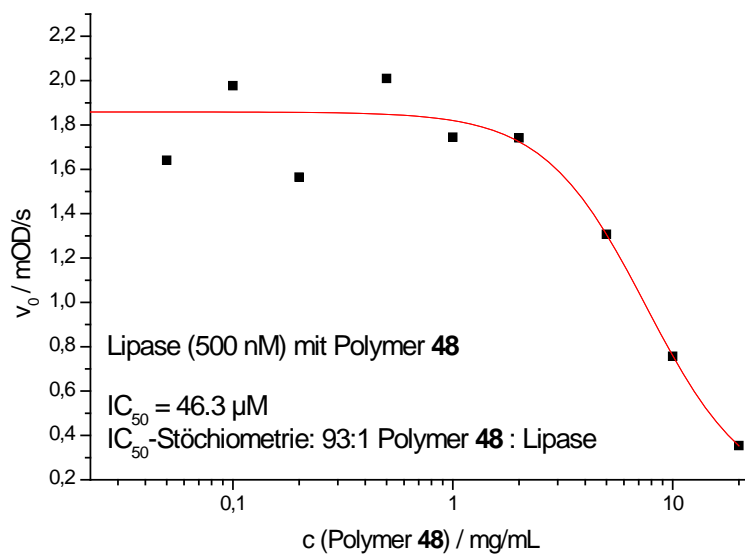


Abb. 5.68: IC₅₀-Kurve: Lipase mit Polymer **48**.

5.4.5. Thrombin

Zur Messung der Thrombinaktivität wird die Hydrolyse des Substrats, *N*-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilin, und die damit verbundene Freisetzung von *p*-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt.

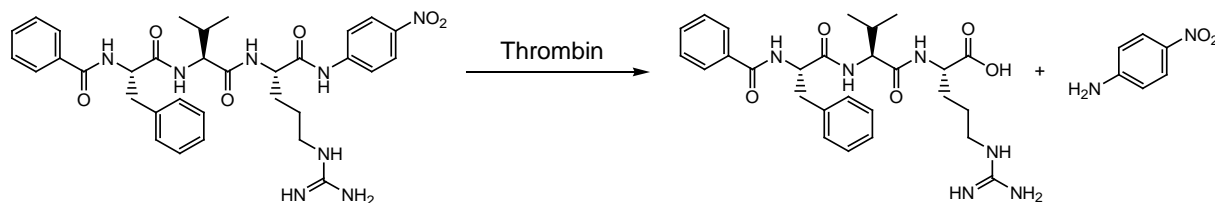


Abb. 5.69: Hydrolytische Spaltung von *N*-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilin durch Thrombin.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Puffer	50 mM Hepes, 200 mM NaCl, pH 7.5
Thrombin	20 µg/mL in Puffer
Substrat	60 µM (in möglichst wenig DMSO gelöst, auf 60 µM mit Puffer verdünnt)

5.4.5.1. Übersichtsspektrum

Zur Vermessung eines UV-Übersichtsspektrums wurden folgende Proben verwendet:

Tab. 5.10: Probenzusammensetzung bei der Messung des UV-Übersichtsspektrums

	Thrombin / µL	Substrat / µL
Substrat	0	100
Substrat + Thrombin	5	100

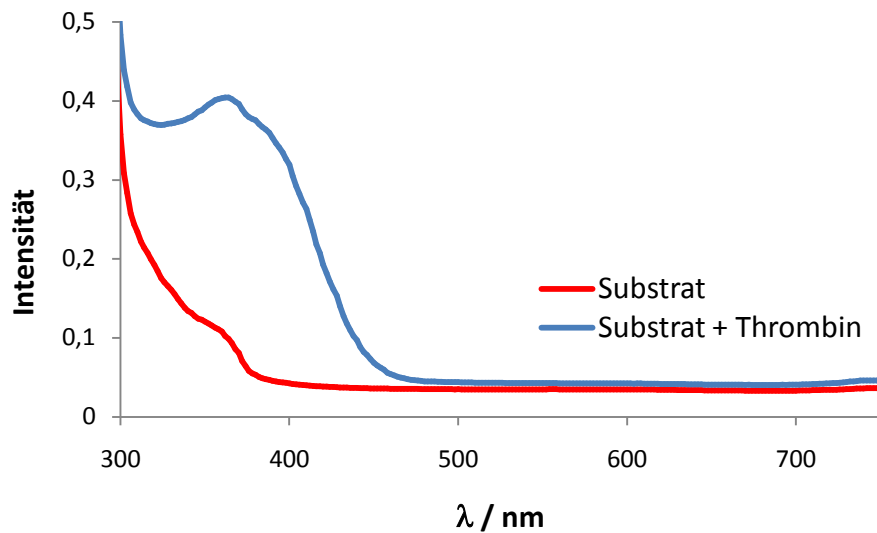


Abb. 5.70: UV-Übersichtsspektrum des Substrats (rot) und des gespaltenen Substrats (blau).

5.4.5.2. Enzymkinetik

Zur Messung der Enzymaktivität des Thrombins wurden die oben angegebenen Lösungen verwendet. Das Gesamtprobenvolumen betrug 100 μL .

Tab. 5.11: Probenzusammensetzung des Thrombin-Enzymassays.

5 μL	Trypsin
5 μL	Polymer-Lösung (Wasser in den Kontrollansätzen)
Inkubation (2 h bei 25°C)	
90 μL	Substrat

Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Zunahme an freiem *p*-Nitroanilin wurde über 30 min alle 20 s gemessen, vor jeder Messung wurde die Probe 4 s geschüttelt.

Da Thrombin nicht inhibiert werden darf, wurde die Aktivität nur mit den Polymeren getestet, die in anderen Enzymassays gute inhibitorische Eigenschaften aufwiesen. Die Konzentration der Polymer-Stammlösungen betrug 20 mg/mL.

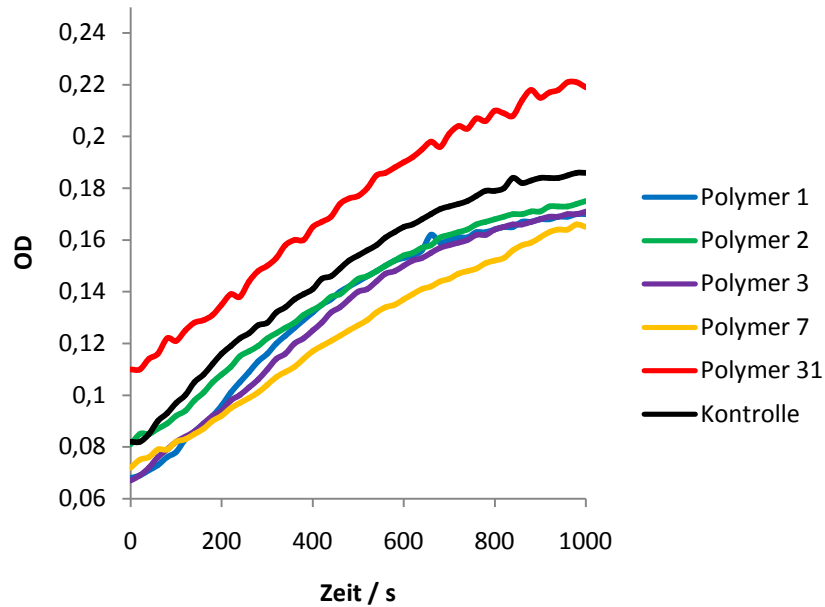


Abb. 5.71: Screening der Polymere 1, 2, 3, 7, 31 auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

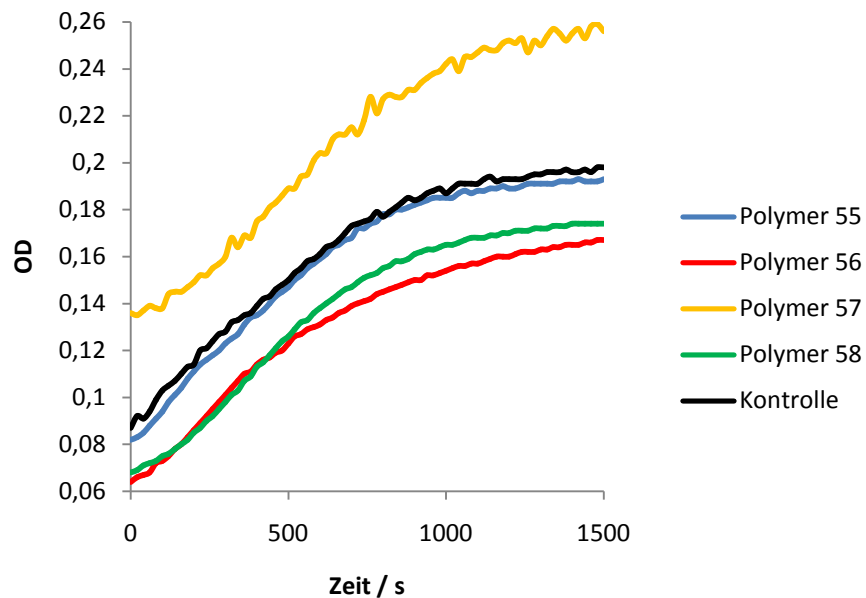


Abb. 5.72: Screening der Polymere 55 - 58 auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

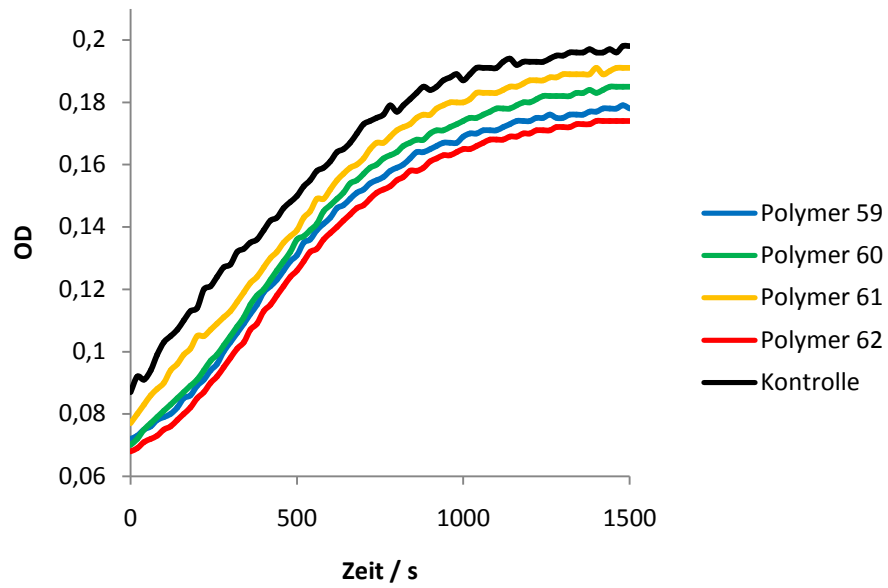


Abb. 5.73: Screening der Polymere **59** - **62** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

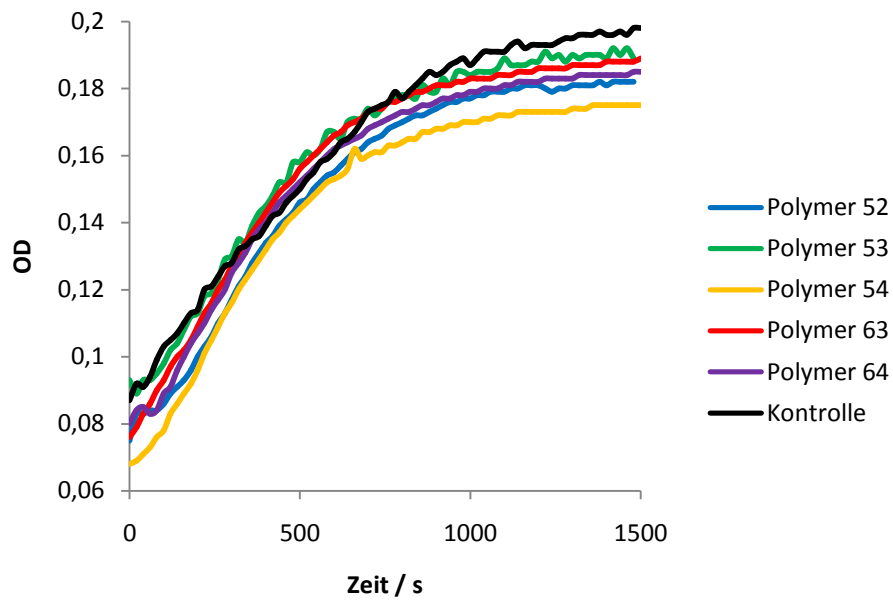


Abb. 5.74: Screening der Polymere **52**, **53**, **54**, **63** und **64** auf ihre inhibitorischen Eigenschaften.

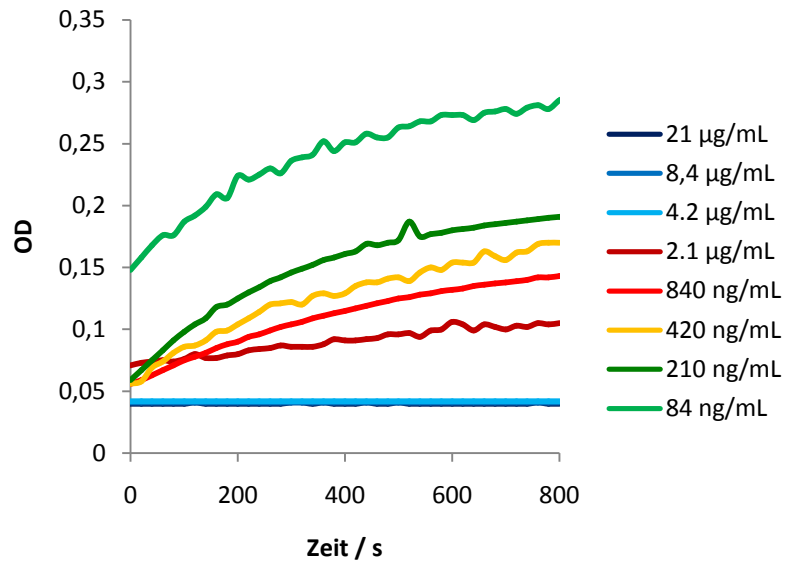


Abb. 5.75: Inhibierung von Thrombin mit dem bekannten Inhibitor Hirudin.

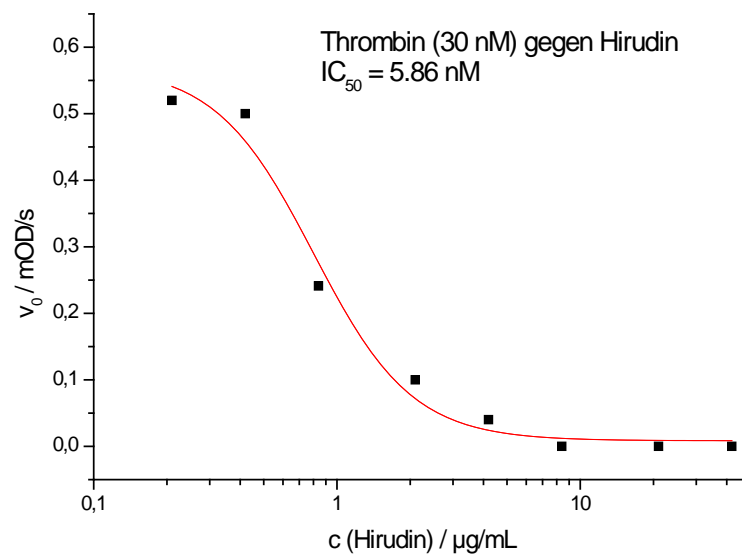


Abb. 5.76: IC_{50} -Kurve von Thrombin mit dem literaturbekannten Inhibitor Aprotinin.

6. Abkürzungsverzeichnis

AIBN	Azoisobutyronitril
Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asn (N)	Asparagin
Asp (D)	Asparaginsäure / Aspartat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BP	Bisphosphonat-Monomer
CatD	Cathepsin D
CBS	Carboxylatbindungsstelle
CD	β-Cyclodextrin-Monomer
Cys (C)	Cystein
CytC	Cytochrom C
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4- <i>N,N'</i> -Dimethylamonipyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
eq	Äquivalent
ESI	Elektrosprayionisation
Et	Ethyl
Gln (Q)	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure / Glutamat

Gly (G)	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid hexafluorophosphat
His (H)	Histidin
HRMS	hochaufgelöste (high resolution) Massenspektrometrie
Ile (I)	Isoleucin
Leu (L)	Leucin
Lys (K)	Lysin
Met (M)	Methionin
M _n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M _w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NTA	Nitrilotriacetat
PAC	Poly(acrylat)
Pd/C	10 % Palladium auf Aktivkohle
PEG	Poly(ethylenglycol)
Phe (F)	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
ppm	parts per million
Pro (P)	Prolin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
Ser (S)	Serin

Thr (T)	Threonin
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosin
Val (V)	Valin
Z	Benzyloxycarbonyl

7. Literaturverzeichnis

- [1] H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2001**, 117, 4200.
- [2] G. C. Terstappen, A. Reggiani, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, 22, 23.
- [3] C. A. Janeway, P. D. Travers, M. J. Walport, J. D. Capra, *Immunology: The Immune System in Health and Disease*, 3. Auflage ed., Garland, New York, **2001**.
- [4] G. A. Michaud, M. Salicius, F. Zhou, R. Bangham, J. Bonin, H. Guo, M. Snyder, P. F. Predki, B. I. Schweitzer, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 12, 1509.
- [5] D. E. Meyer, A. Chilkoti, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 1112.
- [6] N. Kanoh, K. Honda, S. Simizu, M. Muroi, H. Osada, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3625.
- [7] N. Shimizu, K. Sugimoto, J. Tang, T. Nishi, I. Sato, M. Hiramoto, S. Aizawa, M. Hatakeyama, R. Ohba, H. Hatori, T. Yoshikawa, F. Suzuki, A. Oomori, H. Tanaka, H. Kawaguchi, H. Watanabe, H. Handa, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 877.
- [8] K. Tomizaki, K. Usui, H. Mihara, *Chem. Biochem.* **2005**, 6, 782.
- [9] T. L. Schneider, R. S. Mathew, K. P. Rice, K. Tamaki, J. L. Wood, A. Schepartz, *Org. Lett.* **2005**, 7, 1695.
- [10] A. Klakherd, B. S. Sandanaraj, D. R. Vutukuri, S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 9231.
- [11] J. Regan, D. McGarry, J. Bruno, D. Green, J. Newman, C.-Y. Hsu, J. Kline, J. Barton, J. Travis, Y. M. Choi, F. Volz, H. Pauls, R. Harrison, A. Zilberstein, S. A. Ben-Sasson, M. Chang, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 3408.
- [12] A. A. Vaidya, B. S. Lele, M. V. Deshmukh, M. G. Kulkarni, *Chemical Engineering Science* **2001**, 56, 5681.
- [13] M. A. Fazal, B. C. Roy, S. Sun, S. Mallik, K. R. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6283.
- [14] H. Takashima, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Comm.* **1999**, 2345.
- [15] S. N. Gradl, J. P. Felix, E. Y. Isacoff, M. L. Garcia, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12668.
- [16] T. Aya, A. D. Hamilton, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, 2651.
- [17] Q. Lin, H. S. Park, Y. Hamuro, C. S. Lee, A. D. Hamilton, *Biopolymers* **1998**, 47, 285.
- [18] A. Tinazli, J. Tang, a. Ramûnas Valiokas, c] Srdjan Picuric,[a] Suman Lata,[a], a. B. L. Jacob Piehler, [b] and Robert Tamp,*[*Chemistry* **2005**, 11, 5245.
- [19] K. Schulze, A. Mulder, A. Tinazli, R. Tampé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5702.
- [20] S. Lata, M. Gavutis, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365.
- [21] A. Verma, V. M. Rotello, *Chem. Comm.* **2005**, 303.
- [22] G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1812.
- [23] B. Sellergren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1031.
- [24] G. Wulff, T. Grolj, R. Schonfeld, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2050.
- [25] H. Nishino, C.-S. Huang, K. J. Shea, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2452.
- [26] K. Hirayama, Y. Sakai, K. Kameoka, *J. Appl. Pol. Sci.* **2001**, 81, 3378.

- [27] A. A. Vaidya, B. S. Lele, M. G. Kulkarni, R. A. Mashkelar, *J. Appl. Pol. Sci.* **2001**, 81, 1075.
- [28] A. Cutivet, C. Schembri, J. Kovensky, K. Haupt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14699.
- [29] M. Emgenbroich, C. Borrelli, S. Shinde, I. Lazraq, F. Vilela, A. J. Hall, J. Oxelbark, E. De Lorenzi, J. Courtois, A. Simanova, J. Verhage, K. Irgum, K. Karim, B. Sellergren, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 9516
- [30] Dongming He, Wei Sun, T. Schrader, M. Ulbricht, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 253.
- [31] T. Grawe, G. Schäfer, T. Schrader, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1641.
- [32] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5814.
- [33] C. Renner, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [34] C. Renner, *Diplomarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2002**.
- [35] C. Renner, J. Piehler, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 620.
- [36] S. J. Koch, C. Renner, X. Xie, T. Schrader, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6500.
- [37] W. Sun, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2009**.
- [38] K. Wenck, S. Koch, C. Renner, W. Sun, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 16015.
- [39] H. Lippert, *Lehrbuch Anatomie*, 6. Auflage, Urban & Fischer Bei Elsevier, München, **2006**.
- [40] M. Wolff, *Dissertation*, Universität zu Lübeck, **2005**.
- [41] M. W. Büchler, W. Uhl, P. Malfertheiner, M. G. Sarr, *Diseases of the Pancreas*, S. Karger Verlag, Basel, **2004**.
- [42] N. Teich, J. Mössner, *Gastroenterologie* **2007**, 2, 371.
- [43] W. Uhl, M. W. Büchler, P. Malfertheiner, *Gut* **1999**, 45, 97.
- [44] U. Matern, L. Oberer, R. A. Falchetto, M. Erhardc, W. A. König, M. Herdmane, J. Weckesser, *Phytochemistry* **2001**, 58, 1087.
- [45] U. Matern, C. Schleberger, S. Jelakovic, J. Weckesser, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 997.
- [46] T. Rohrlack, K. Christoffersen, M. Kaebernick, B. A. Neilan, *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, 70, 5047.
- [47] M. Murakami, Q. Sun, K. Ishida, H. Matsuda, T. Okino, K. Yamaguchi, *Phytochemistry* **1997**, 45, 1197.
- [48] M. Murakami, Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino, K. Yamaguchi, *Tetrahedron Letters* **1994**, 35, 3129.
- [49] K. I. Harada, K. Fujii, T. Shimada, M. Suzuki, H. Sano, K. Adachi, W. W. Carmichael, *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 1511.
- [50] K. Ersmark, J. R. D. Valle, S. Hanessian, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1220.
- [51] M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, 452, 755.
- [52] J. Clerc, M. Groll, D. J. Illich, A. S. Bachmann, R. Huber, B. Schellenberg, R. Dudler, M. Kaiser, *PNAS* **2009**, 106, 6507.
- [53] C. Schmidt, *Peptides* **1991**, 100, 761.
- [54] C. M. Rosenberger, R. L. Gallo, B. B. Finlay, *PNAS* **2004**, 101, 2422.
- [55] A. Sonawane, J. Jyot, R. During, R. Ramphal, *Infection and Immunity* **2006**, 74, 6682.
- [56] A. Valenzuela-Fernández, T. Planchenault, F. Baleux, I. Staropoli, K. Le-Barillec, D. Leduc, T. Delaunay, F. Lazarini, J.-L. Virelizier, M. Chignard, D. Pidard, F. Arenzana-Seisdedosa, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 15677.

- [57] K. Suzuki, H. Nakajima, K. Ikeda, T. Tamachi, T. Hiwasa, Y. Saito, I. Iwamoto, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, 309, 768.
- [58] D.-M. Zhu, F. M. Uckun, *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 2064.
- [59] D. Brömme, D. H.-U., *Methods Enzymol.* **1994**, 244, 671.
- [60] N. Zaidi, T. Burster, V. Sommandas, T. Herrmann, B. O. Boehm, C. Driessen, W. Voelter, H. Kalbacher, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, 364, 243.
- [61] K. Isahara, Y. Ohsawa, S. Kanamori, M. Shibata, S. Waguri, N. Sato, T. Gotow, T. Watanabe, T. Momoi, K. Urase, E. Kominami, Y. Uchiyama, *Neuroscience* **1999**, 91, 233.
- [62] T. Ravid, R. Doolman, R. Avner, D. Harats, J. Roitelman, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 35840.
- [63] Lili Zhang, Lixin Song, E. M. Parker, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 8966.
- [64] S. Chatterjee, Z.-Q. Gu, D. Dunn, M. Tao, K. Josef, R. Tripathy, R. Bihovsky, S. E. Senadhi, T. M. O'Kane, B. A. McKenna, S. Mallya, M. A. Ator, D. Bozyczko-Coyne, R. Siman, J. P. Mallamo, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2663.
- [65] P. Dutt, J. S. C. Arthur, D. E. Croall, J. S. Elce, *FEBS Letters* **1998**, 436, 367.
- [66] R. E. Esser, R. A. Angelo, M. D. Murphey, L. M. Watts, L. P. Thornburg, J. T. Palmer, J. W. Talkhouk, R. E. Smith, *Arthritis & Rheumatism* **1994**, 37, 236.
- [67] J. Inoue, M. Nakamura, Y.-S. Cui, Y. Sakai, O. Sakai, J. R. Hill, K. K. W. Wang, P.-W. Yuen, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 868.
- [68] M. Tsiang, A. K. Jain, C. S. Gibbs, *J. Med. Chem.* **1997**, 272, 12024.
- [69] F. Markwardt, *Methods in Enzymology* **1970**, 19, 924.
- [70] B. Bister, S. Keller, H. I. Baumann, G. Nicholson, S. Weist, G. Jung, R. D. Süssmuth, F. Jüttner, *J. Nat. Proc.* **2004**, 67, 1755.
- [71] D. Bassi, N. Kollias, C. F.-d. Castillo, T. Foitzik, A. I. Warshaw, D. W. Rattner, *J. Am. Coll. Surg.* **1994**, 179, 257.
- [72] R. C. Kukreja, Y. Janin, *J. Thromb. Thrombolysis* **1997**, 4, 7.
- [73] S. Szalay, *Dissertation*, Justus-Liebig-Universität Gießen, **1997**.
- [74] C. Csonka, E. Varga, P. Kovacs, P. Ferdinandy, I. E. Blasig, Z. Szilvassy, A. Tosaki, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 27, 119.
- [75] R. C. Kukreja, *Ann. NY Acad. Sci.* **1999**, 874, 211.
- [76] O. Okubo, O. Wildner, M. R. Shah, J. C. Chelliah, M. L. Hess, R. C. Kukreja, *Circulation* **2001**, 103, 877.
- [77] N. B. Radford, M. Fina, I. J. Benjamin, R. W. Moreadith, K. H. Graves, P. Zhao, S. Gavva, A. Wiethoff, A. D. Sherry, C. R. Malloy, R. S. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 2339.
- [78] C. A. Bradham, R. F. Stachlewitz, W. Gao, T. Qian, S. Jayadev, G. Jenkins, Y. Hanum, J. J. Lemasters, R. G. Thurman, D. A. Brenner, *Hepatology* **1997**, 25, 1128.
- [79] K. Ito, H. Ozasa, K. Sananda, S. Horikawa, *Hepatology* **2000**, 31, 416.
- [80] Z. Akcetin, R. Pregla, A. Busch, G. Kessler, H. Heynemann, J. Holtz, H. Bromme, *Urol. Int.* **2000**, 65, 32.
- [81] C. Aufricht, E. Lu, G. Thulin, M. Kashgarian, N. J. Siegel, S. K. v. Why, *Am. J. Physiol.* **1998**, 274, F268.
- [82] M. Hiratsuka, B. N. Mora, M. Yano, T. Mohanakumar, G. A. Patterson, *Ann. Thorac. Surg.* **1999**, 67, 1421.
- [83] C. Carroll, S. Carroll, M. Overgoor, G. Tobin, J. Barker, *Plast. Reconstr. Surg.* **1997**, 100, 58.
- [84] L. M. Valentim, A. B. Geyer, A. Tavares, H. Cimarosti, P. V. Worm, R. Rodnight, C. A. Netto, C. G. Salbego, *Neuroscience* **2001**, 107, 43.

- [85] A. Sola, J. D. Oca, R. Gonzalez, N. Prats, J. Rosello-Catafau, E. Gelpi, E. Jaurieta, G. Hotter, *Ann. Surg.* **2001**, 234, 98.
- [86] C. F.-d. Castillo, W. Harringer, A. L. Warshaw, G. J. Vlahakes, *N. Engl. J. Med.* **1991**, 352, 382.
- [87] H. P. Grewal, L. Garland, K. Novak, L. Gaber, E. A. Tolley, A. O. Gaber, *Transplantation* **1993**, 56, 609.
- [88] E. Klar, J. Werner, *Chirurg* **2000**, 71, 153.
- [89] S. Benz, R. Wiessner, R. Obermaier, F. Pfeffer, U. T. Hopt, *Transpl. Int.* **2002**, 15, 173.
- [90] L. Gullo, L. Cavicci, P. Tomasetti, C. Spangnolo, A. Freyrie, M. D'Addato, *Gastroenterology* **1996**, 111, 1033.
- [91] S. Benz, F. Pfeffer, U. Adam, W. Schareck, U. T. Hopt, *Transpl. Int.* **1998**, 11, S433.
- [92] R. T. Ethridge, R. A. Ehlers, M. R. Hellmich, S. Rajaraman, B. M. Evers, *Pancreas* **2000**, 21, 248.
- [93] X. Xu, W. Zeng, J. Diaz, K. S. Lau, A. C. Gukovskaya, R. J. Brown, S. J. Pandol, S. Muallem, *Cell Calcium* **1997**, 22, 217.
- [94] M. H. Schönberg, M. J. Büchler, H. G. Beger, *Hepatogastroenterol* **1994**, 41, 313.
- [95] H. Jaeschke, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2003**, 284, G15.
- [96] T. Grady, M. Mah'moud, T. Otani, S. Rhee, M. M. Lerch, F. S. Gorelick, *J. Am. Physiol.* **1998**, 275, G1010.
- [97] E. A. Deitch, H. P. Shi, Q. Lu, E. Feketeova, D. Z. Xu, *Shock* **2003**, 19, 452.
- [98] G. W. Schmidt-Schönbein, *Mol. Cell. Biomech.* **2008**, 5, 83.
- [99] I. G. Schoots, M. Levi, A. K. v. Vliet, A. M. Maas, E. H. P. Roossink, T. M. v. Gulik, *Crit. Care Med.* **2004**, 32, 1375.
- [100] D. Pruefer, J. Makowski, M. Dahm, S. Guth, H. Oelert, H. Darius, M. Buerke, *Ann. Thorac. Surg.* **2003**, 75, 210.
- [101] I. H. Mallick, W. Yang, M. C. Winslet, A. M. Seifalian, *Dig. Dis. Sci.* **2004**, 49, 1359.
- [102] H. Tsuboi, Y. Naito, K. Katada, T. Takagi, O. Handa, S. Kokura, H. Ichikawa, N. Yoshida, M. Tsukada, T. Yoshikawa, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **2007**, 292, G678.
- [103] S. Koch, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [104] P. C. Weber, S.-L. Lee, F. A. Lewandowski, M. C. Schadt, C.-H. Chang, C. A. Kettner, *Biochemistry* **1995**, 34, 3750.
- [105] W. Sun, H. Bandmann, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7701.
- [106] C. Schmuck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2397.
- [107] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules* **2002**, 35, 6192.
- [108] C. Straßnig, *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, **2007**.
- [109] C. Schmuck, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2432.
- [110] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 709.
- [111] C. Schmuck, M. Schwegmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 3373.
- [112] G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 803.
- [113] J. Szejtli, *J. Mat. Chem.* **1997**, 7, 575.
- [114] B. Brady, N. Lynam, T. O'Sullivan, C. Ahern, R. Darcy, *Org. Synth.* **2004**, 10, 686.
- [115] K. Wenck, *Diplomarbeit*, Philipps Universität Marburg, **2006**.
- [116] S. J. Koch, C. Renner, X. L. Xie, T. Schrader, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 6352.

- [117] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- [118] J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Biochemie*, 6. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2007**.
- [119] H. Rehn, F. Hammer, *Biochemie light*, 2. Auflage, Verlag Hari Deutsch, Frankfurt am Main, **2001**.
- [120] F. Lottspeich, J. W. Engels, A. Simeon, *Bioanalytik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [121] D. M. Blow, J. J. Birktoft, B. S. Hartley, *Nature* **1969**, 221, 337.
- [122] N. Ui, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 229, 582.
- [123] R. M. Stroud, A. A. Kossiakoff, J. L. Chambers, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1977**, 6, 177
- [124] K. Soman, A.-S. Yang, B. Honig, R. Fletterick, *Biochemistry* **1989**, 28, 9918.
- [125] J. J. Perona, C. S. Craig, *Protein Science* **1995**, 4, 337.
- [126] A. M. Lesk, W. D. Fordham, *J. Mol. Biol.* **1996**, 258, 501.
- [127] P. S. Sears, D. S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 118.
- [128] O. Geisel, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2007**.
- [129] R. Willstätter, E. Bamann, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **1928**, 180, 127.
- [130] A. H. Erickson, G. E. Conner, G. Blobel, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 11224.
- [131] K. Roberg, U. Johansson, K. O'Llinger, *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, 27, 1228.
- [132] A. Kenessey, M. Banay-Schwartz, T. DeGuzman, A. Lajtha, *Journal of Neuroscience Research* **1989**, 23, 454.
- [133] Y. Nakamura, M. Takeda, H. Suzuki, H. Morita, K. Tada, S. Hariguchi, T. Nishimura, *Neuroscience Letters* **1989**, 97, 215.
- [134] E. A. Mackkay, A. Ehrhard, M. Moniatte, C. Guenet, C. Tardif, C. Tarnus, O. Sorokine, B. Heintzelmann, C. Nay, J.-M. Remy, J. Higaki, A. V. Dorsselaer, J. Wagner, C. Danzin, P. Mamont, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 224, 414.
- [135] Ö. Albayrak, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2007**.
- [136] T. E. Kute, Z.-M. Shao, N. K. Sugg, R. T. Long, G. B. Russell, L. D. Case, *Cancer Research* **1992**, 52, 5198.
- [137] H. Rochefort, E. Liaudet-Coopman, *APMIS* **1999**, 107, 86.
- [138] Y. Yasuda, *J. Biochem.* **1999**, 125, 1137.
- [139] H. D. Beer, G. Wohlfahrt, J. E. G. McCarthy, D. Schomburg, R. D. Schmidt, *Protein Engineering* **1996**, 9, 507.
- [140] Y. Yang, M. E. Lowe, *J. Lipid Res.* **2000**, 41, 48.
- [141] M. Fischer, *Dissertation*, Universität Stuttgart, **2004**.
- [142] P. Hildebrand, C. Petrig, B. Burckhardt, S. Ketterer, H. Lengsfeld, *Gastroenterology* **1998**, 114, 123.
- [143] L. Zieve, B. Mulford, A. McHale, *Am. J. Dig. Dis.* **1966**, 11, 685.
- [144] L. Zieve, S. E. Silvis, B. Mulford, W. D. Blackwood, *Am. J. Dig. Dis.* **1966**, 11, 671.
- [145] F. K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature* **1990**, 343, 771.
- [146] A. Roussel, S. Canaan, M.-P. Egloff, M. Rivière, L. Dupuis, R. Verger, C. Cambillau, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16995.
- [147] D. Blow, *Nature* **1991**, 351, 444.
- [148] J. Fokkens, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2005**.
- [149] M. Crook, *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1990**, 1, 167.
- [150] P. B. Tracy, M. E. Nesheim, K. G. Mann, *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, 743.
- [151] R. D. Rosenberg, P. S. Damus, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6490.

- [152] S. L. Gonias, *Exp. Hematol.* **1992**, 20, 302.
- [153] D. M. Tollefsen, D. W. Majerus, M. K. Blank, *The Journal of Biological Chemistry* **1982**, 257, 2162.
- [154] R. Machovich, *The Thrombin* **1984**, 1, 111.
- [155] P. G. Righetti, G. Tudor, *Journal of Chromatography* **1981**, 220, 115.
- [156] J. Dodt, *FEBS Letters* **1984**, 165, 180.
- [157] T. J. Rydel, A. Tulinsky, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 583.
- [158] R. Wirnt, *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. II*, Academic Press Inc., New York, **1974**.
- [159] A. Cutivet, C. Schembri, J. Kovensky, K. Haupt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14699.
- [160] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, E. Fanghänel, J. Faust, M. Fischer, F. Gentz, K. Gewalt, R. Gluch, R. Mayer, K. Müller, D. Pavel, H. Schmidt, K. Schollberg, K. Schwetlick, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 23. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.

8. Spektrenanhang

NTA-Monomer 8

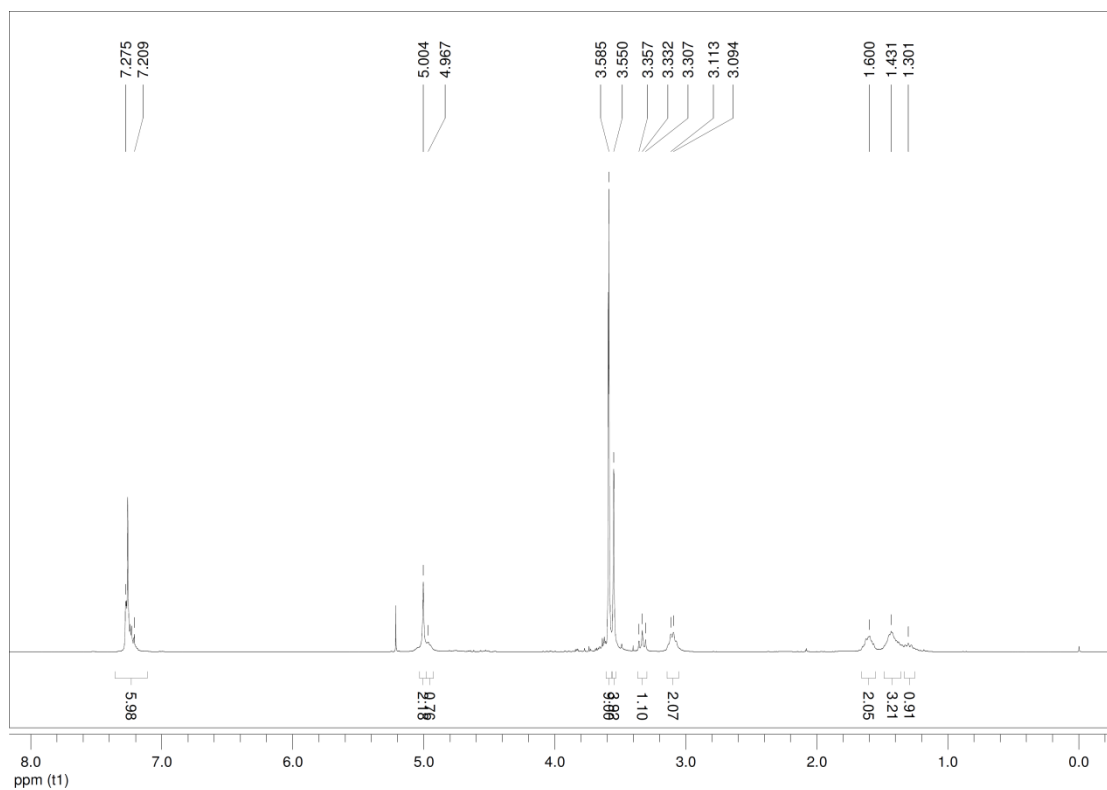


Abb. 8.1: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **8.1**.

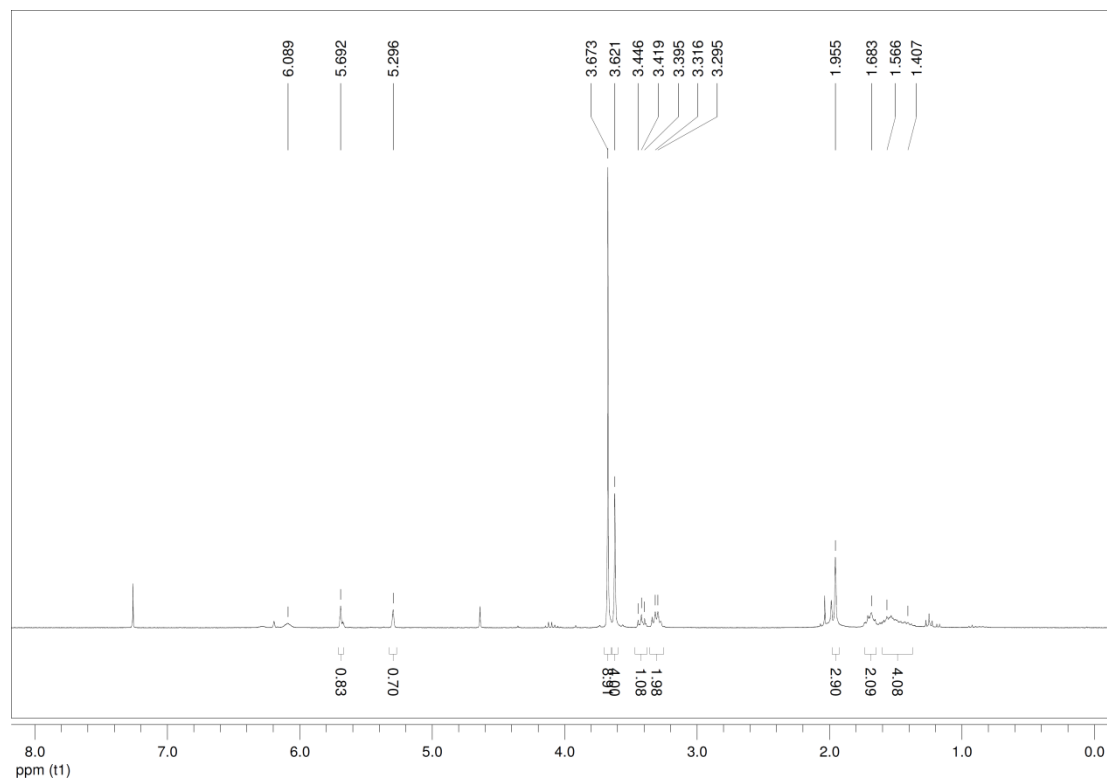


Abb. 8.2: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **8.3**.

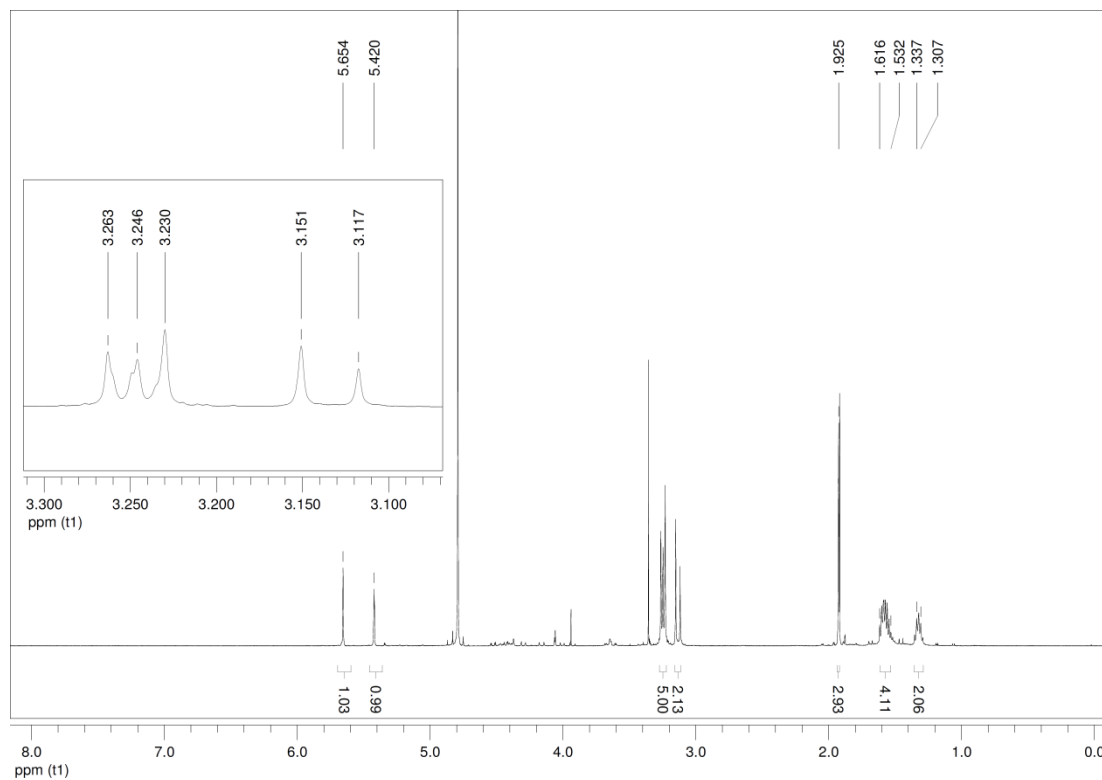


Abb. 8.3: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in D_2O) von **8**.

CBS-Monomer 7

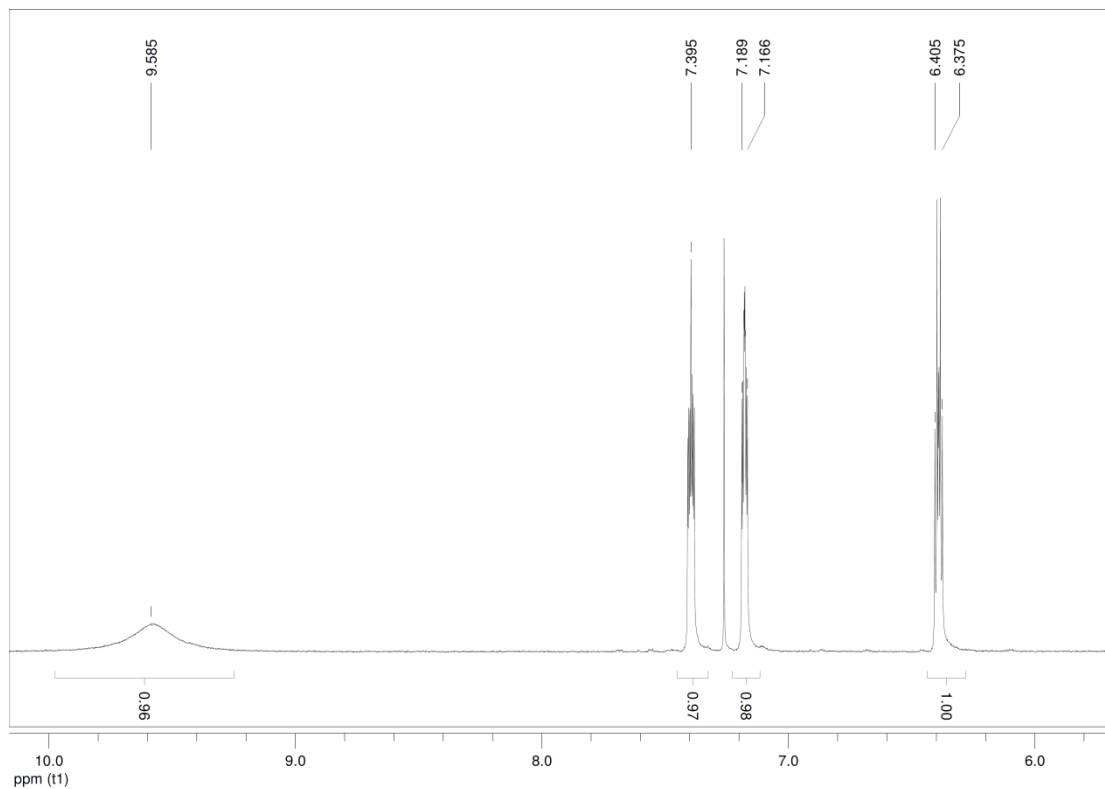
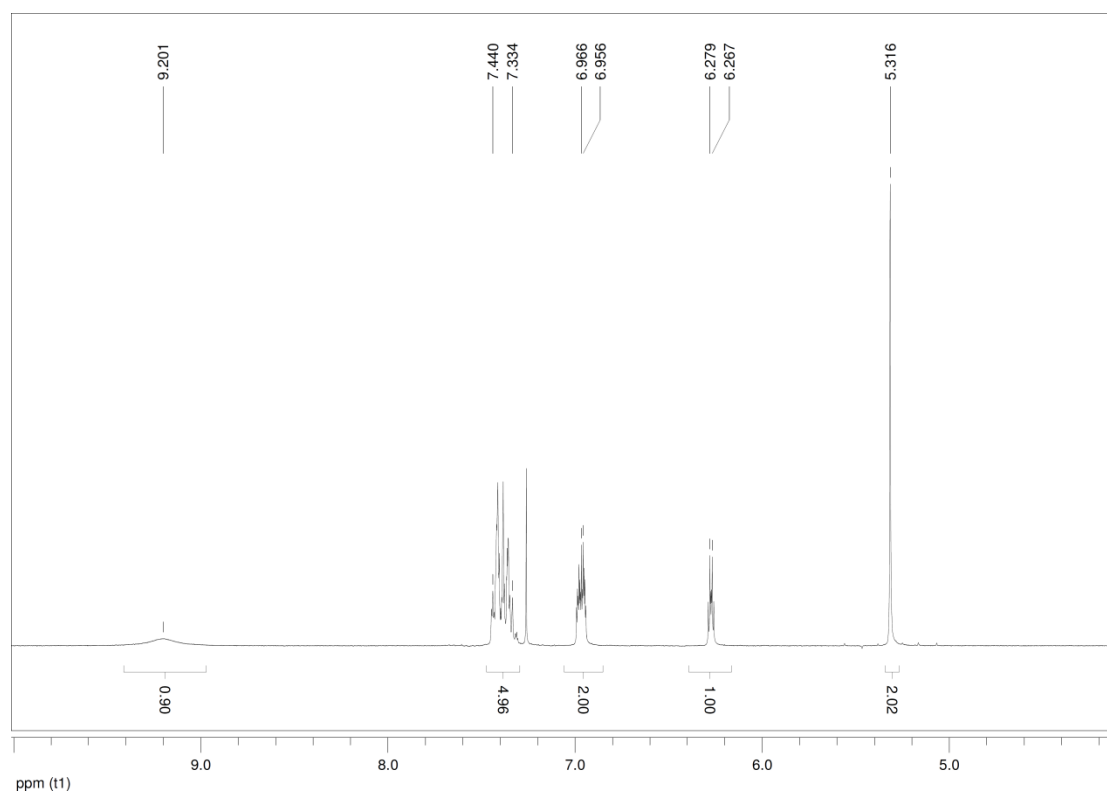
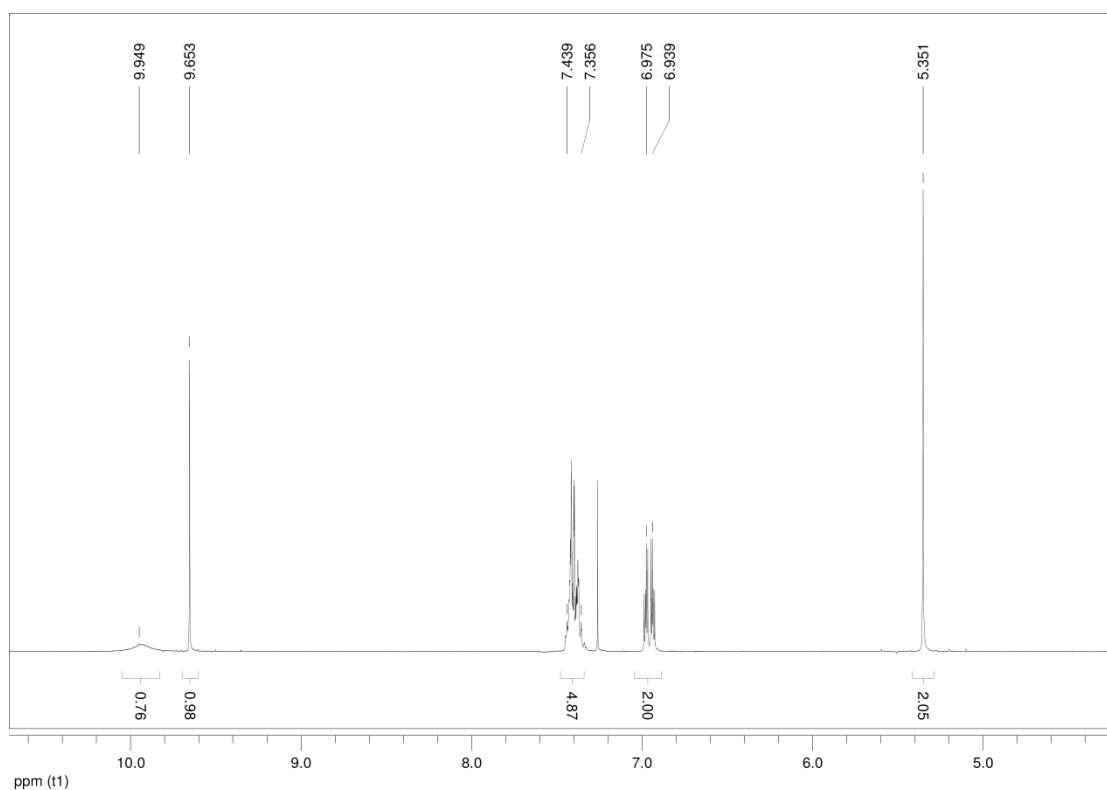


Abb. 8.4: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl_3) von **7.1**.

Abb. 8.5: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von 7.2.Abb. 8.6: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von 7.3.

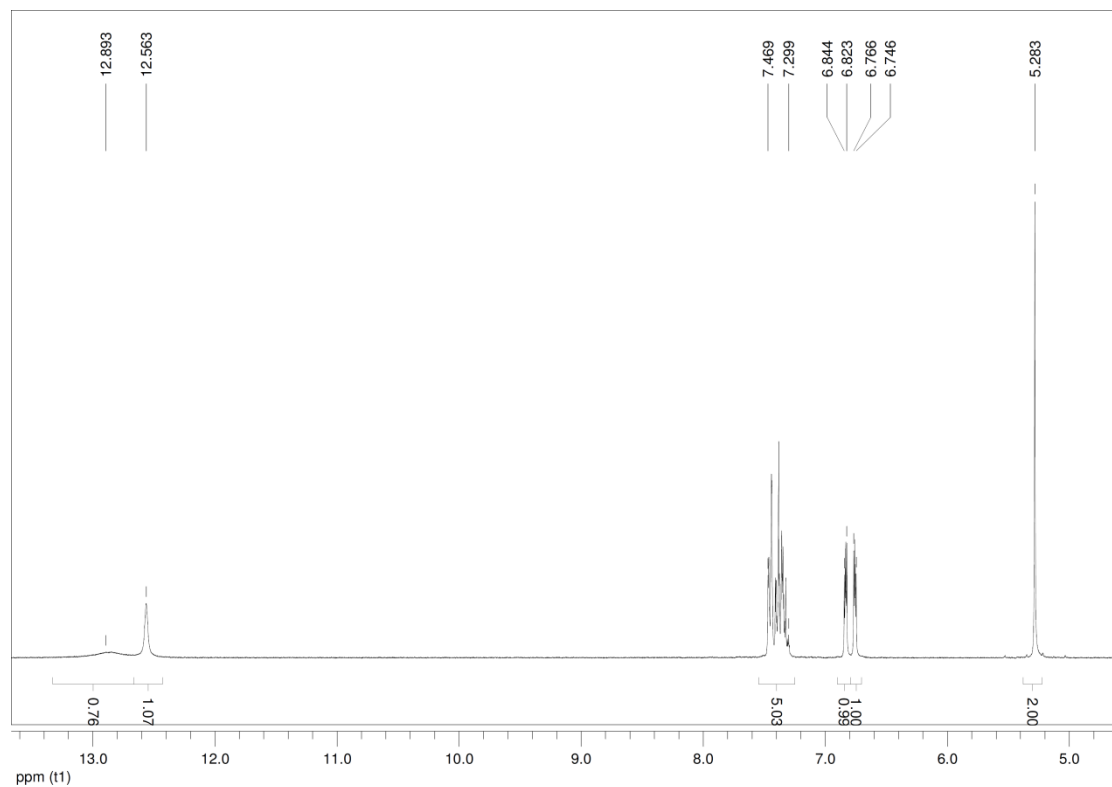


Abb. 8.7: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d₆) von 7.4.

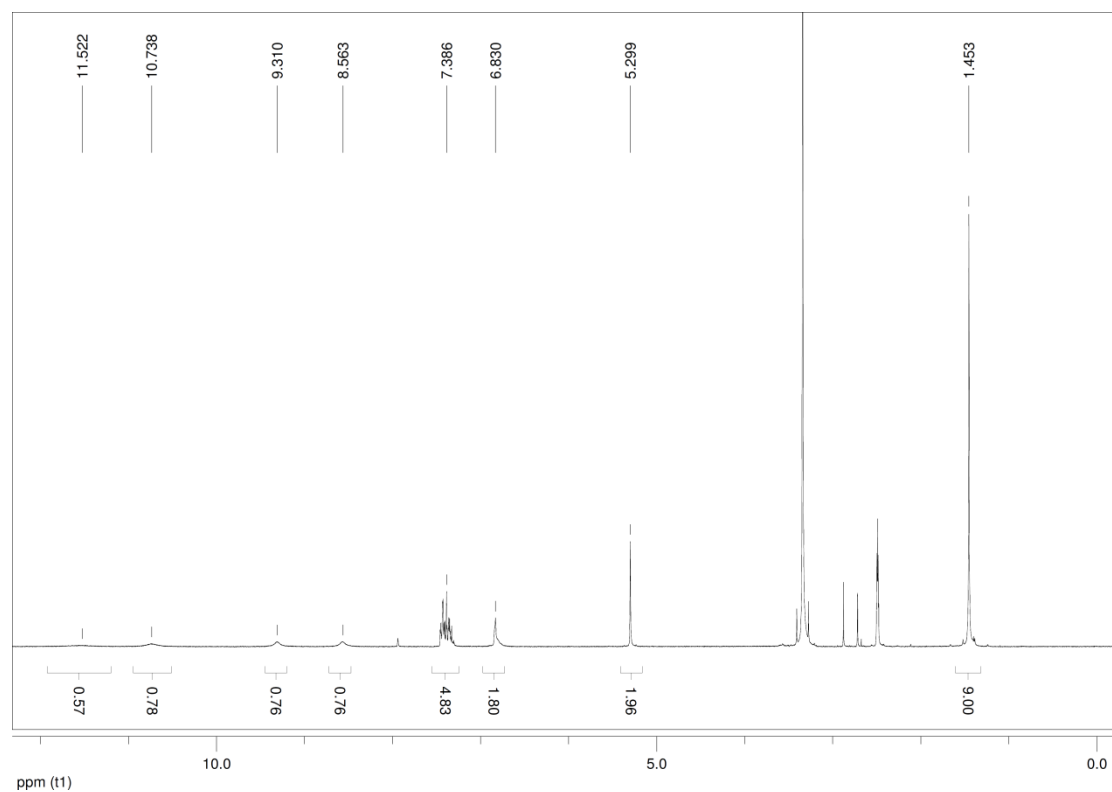
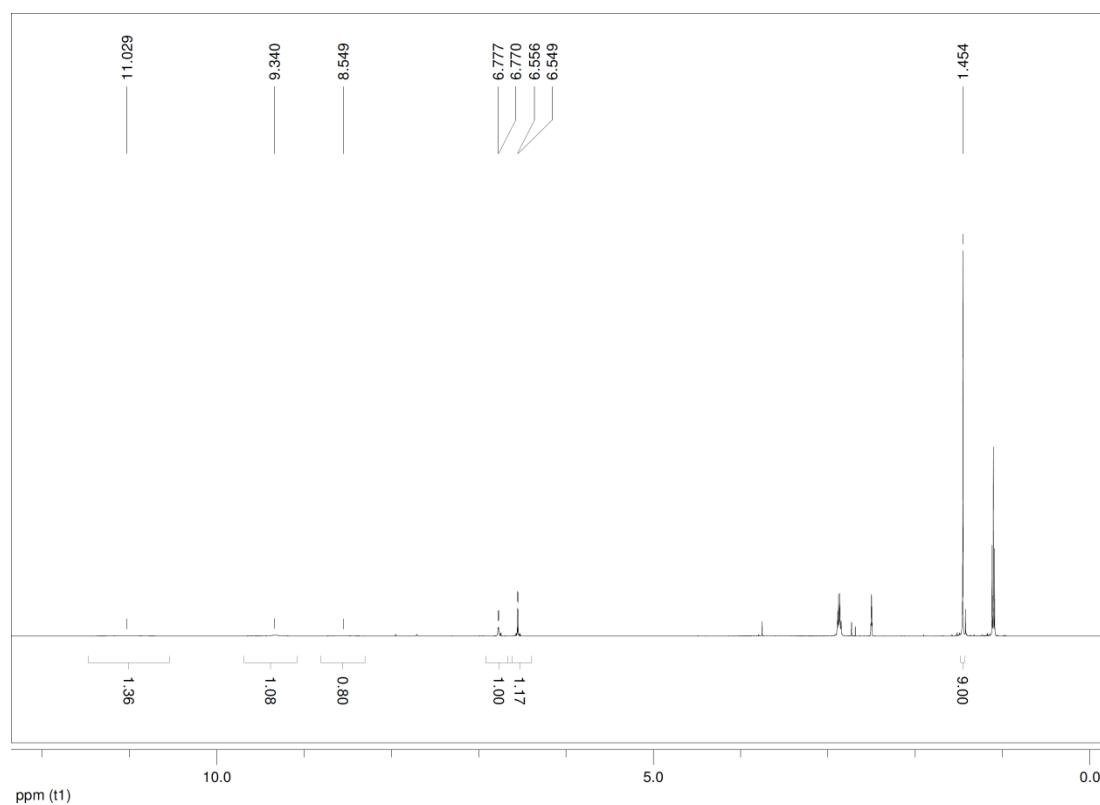
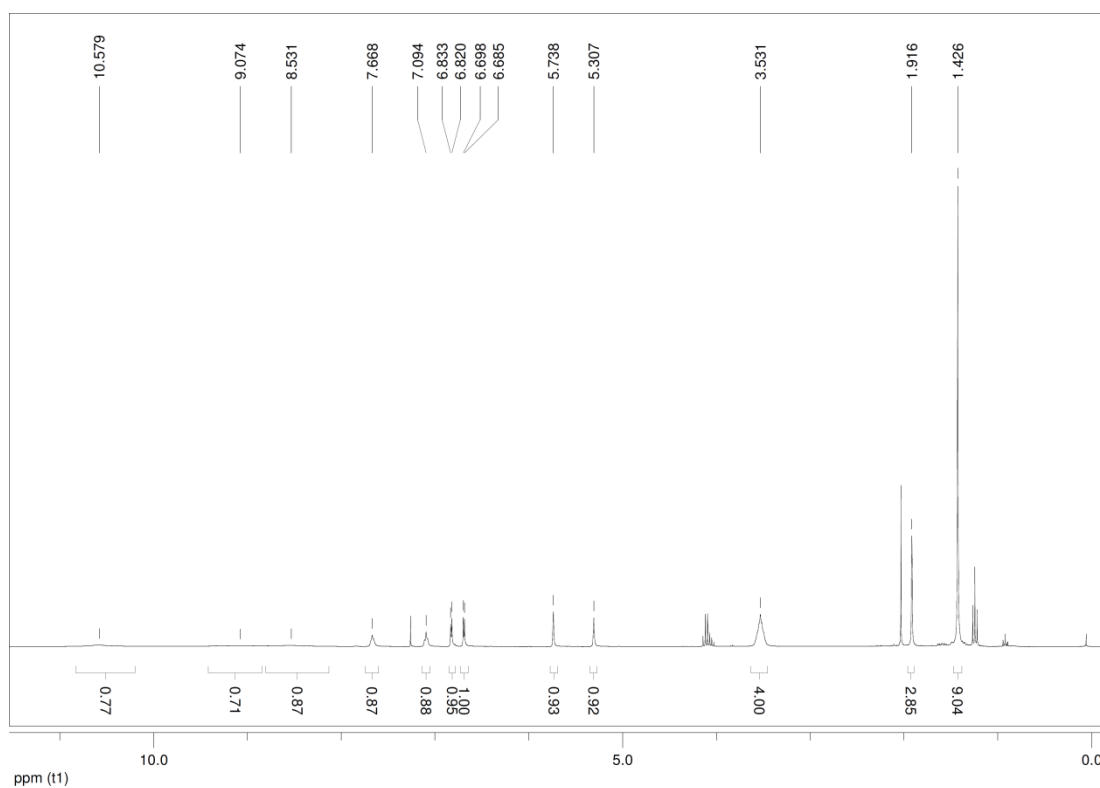


Abb. 8.8: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d₆) von 7.5.

Abb. 8.9: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d₆) von 7.6.Abb. 8.10: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von 7.7.

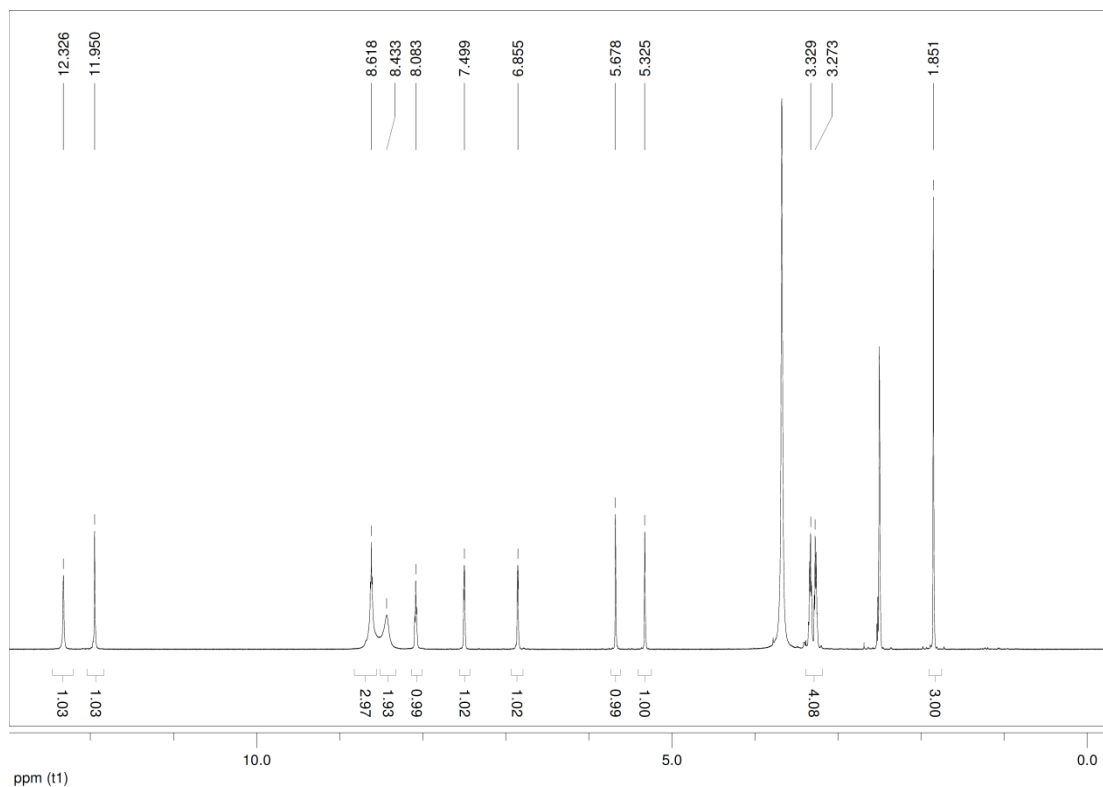


Abb. 8.11: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d₆) von **7**.

BP-Monomer 6

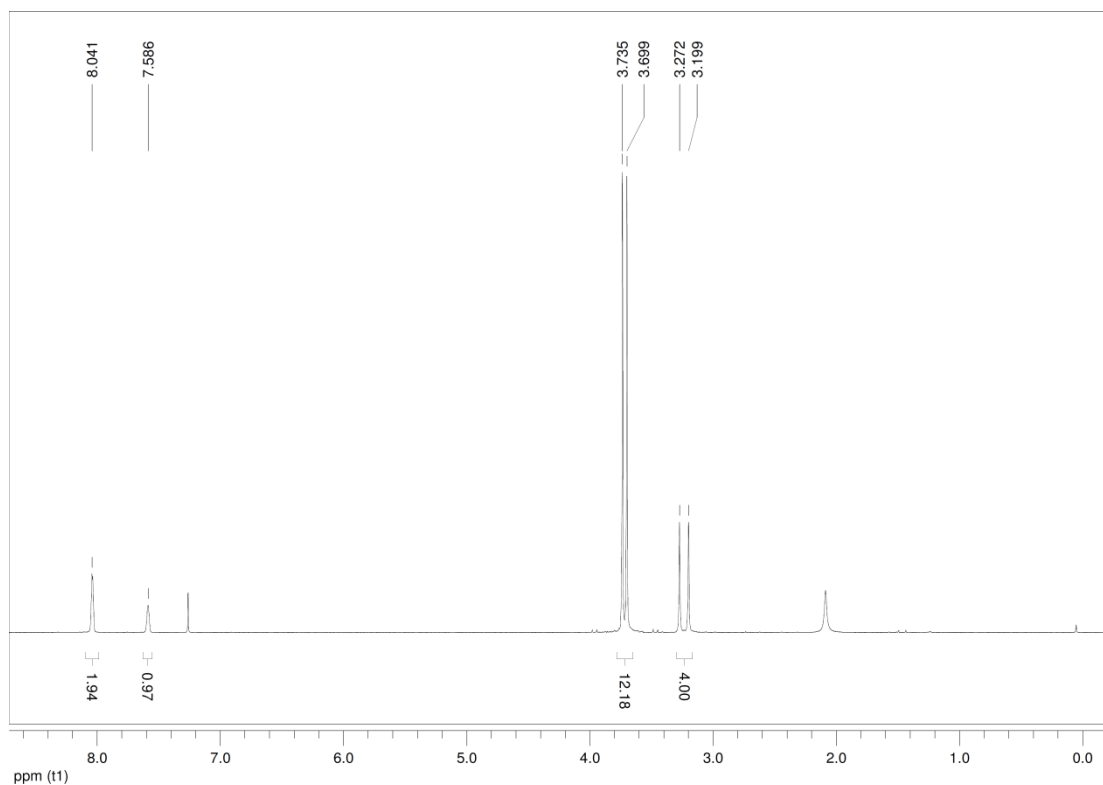
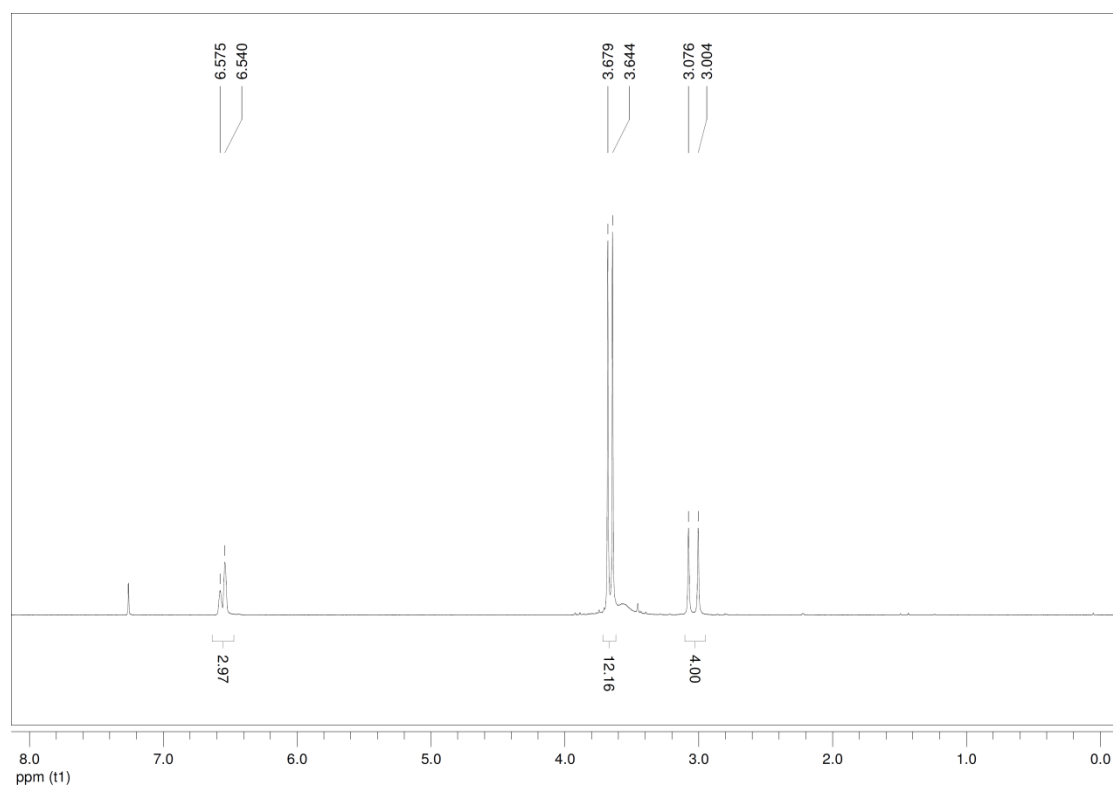
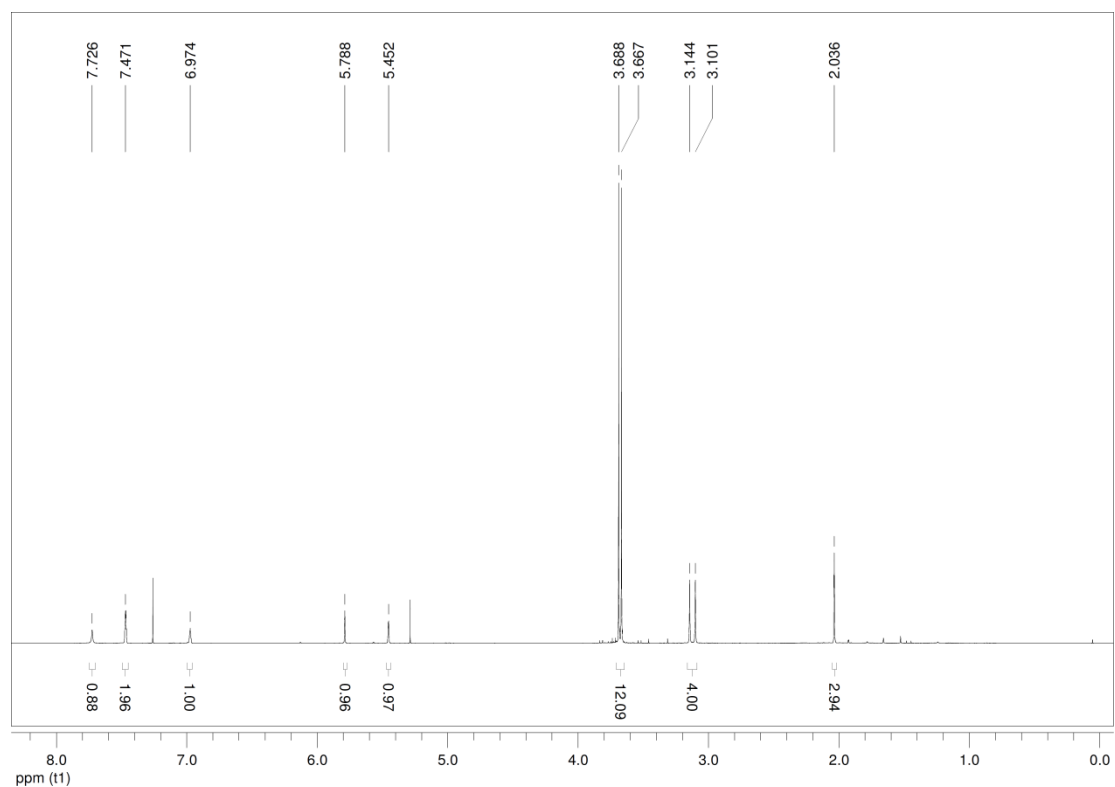
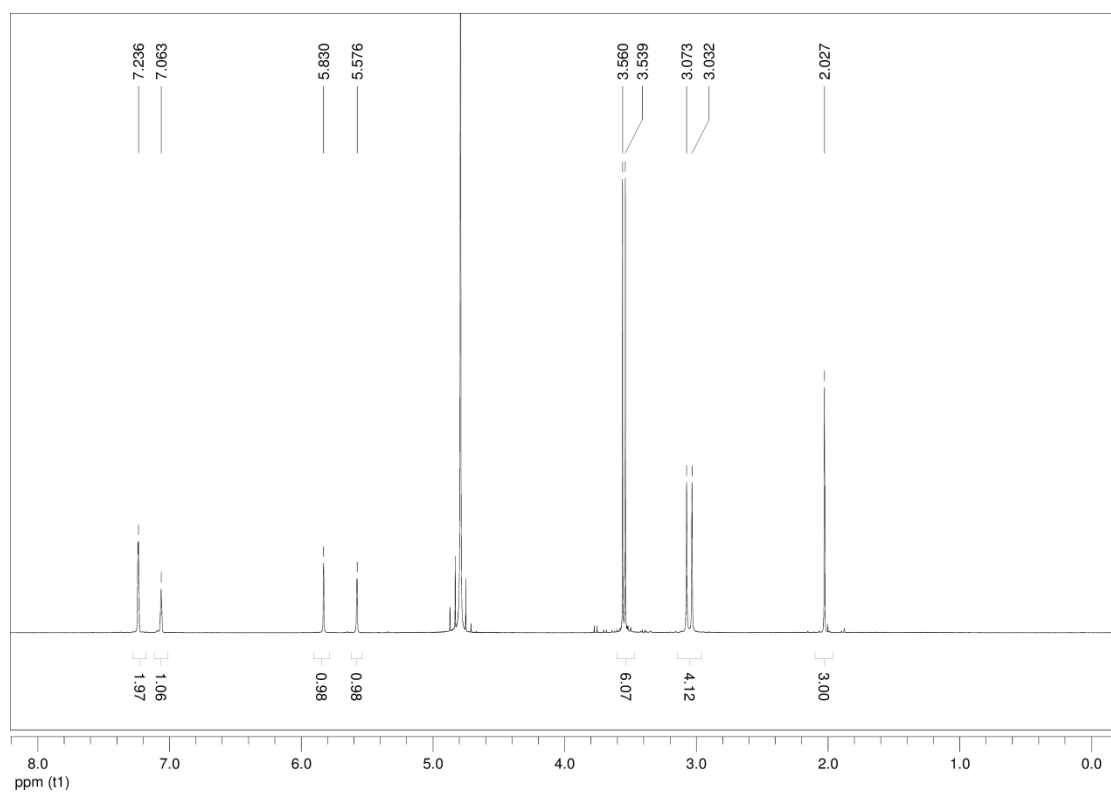
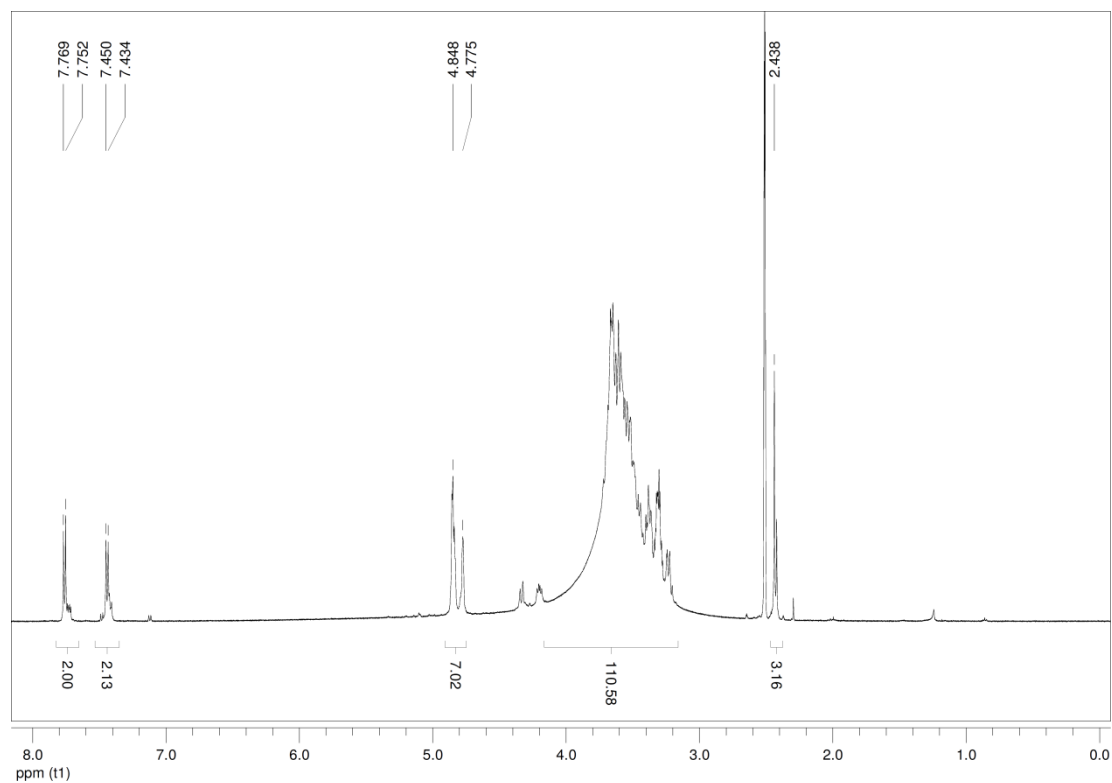
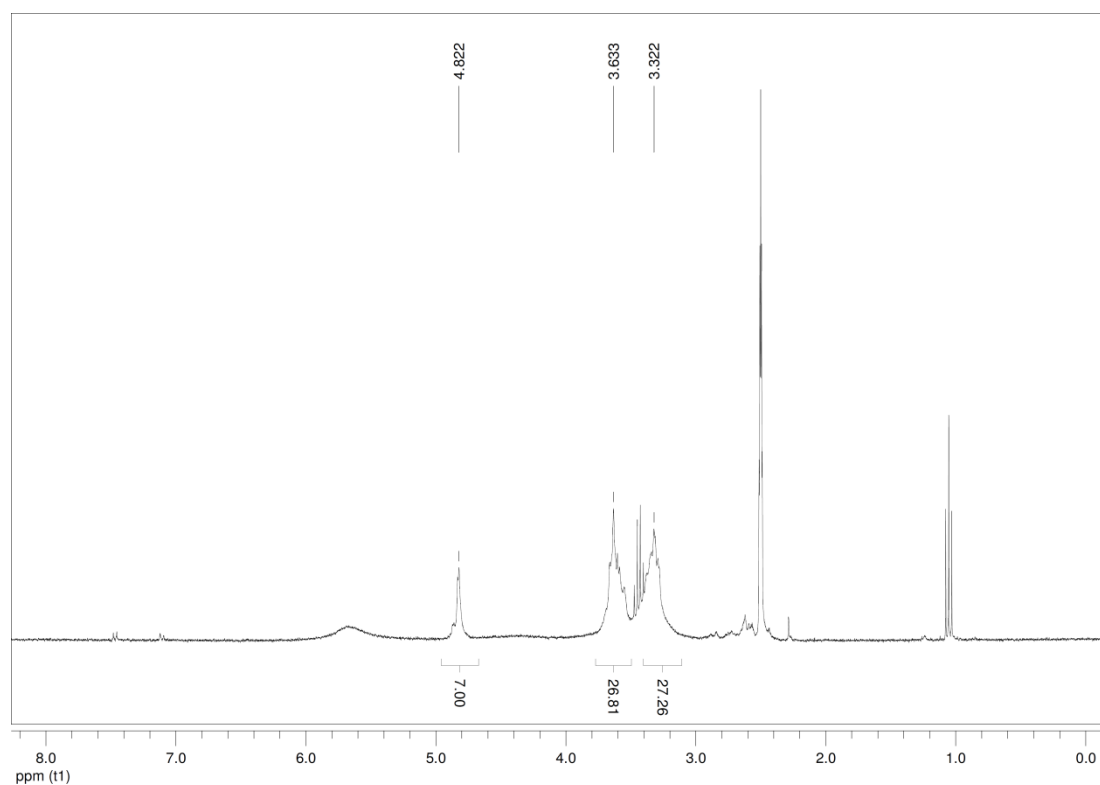
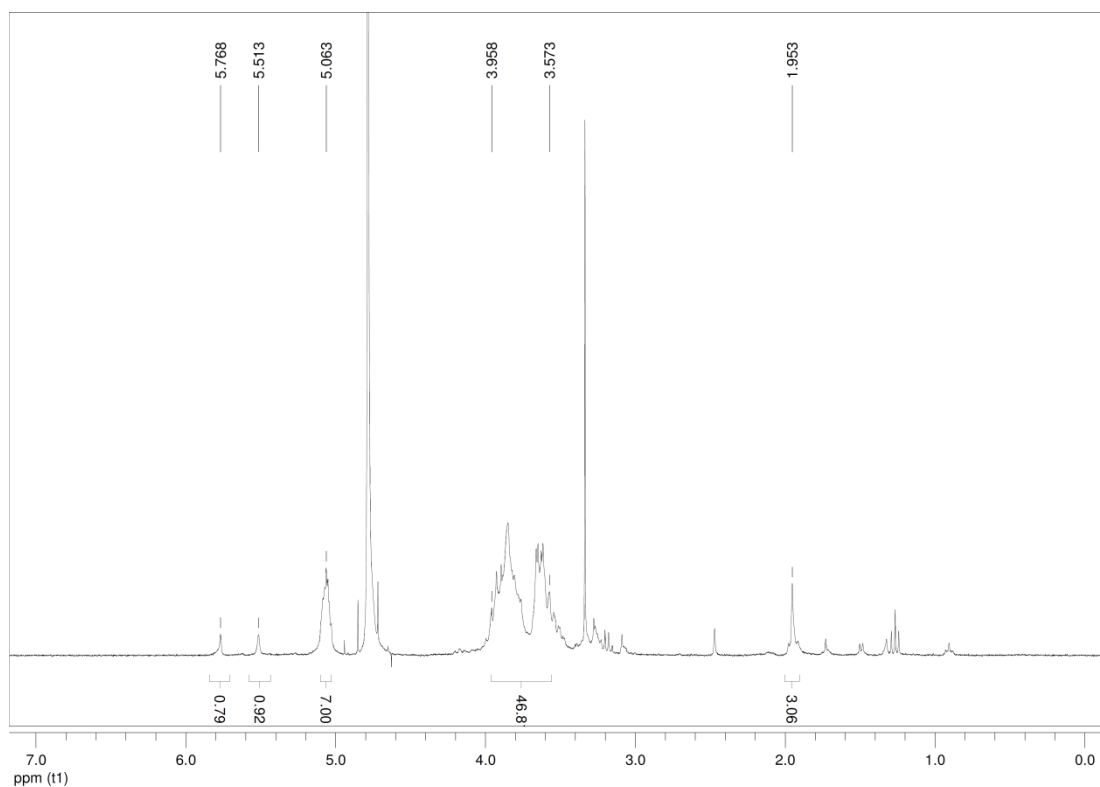


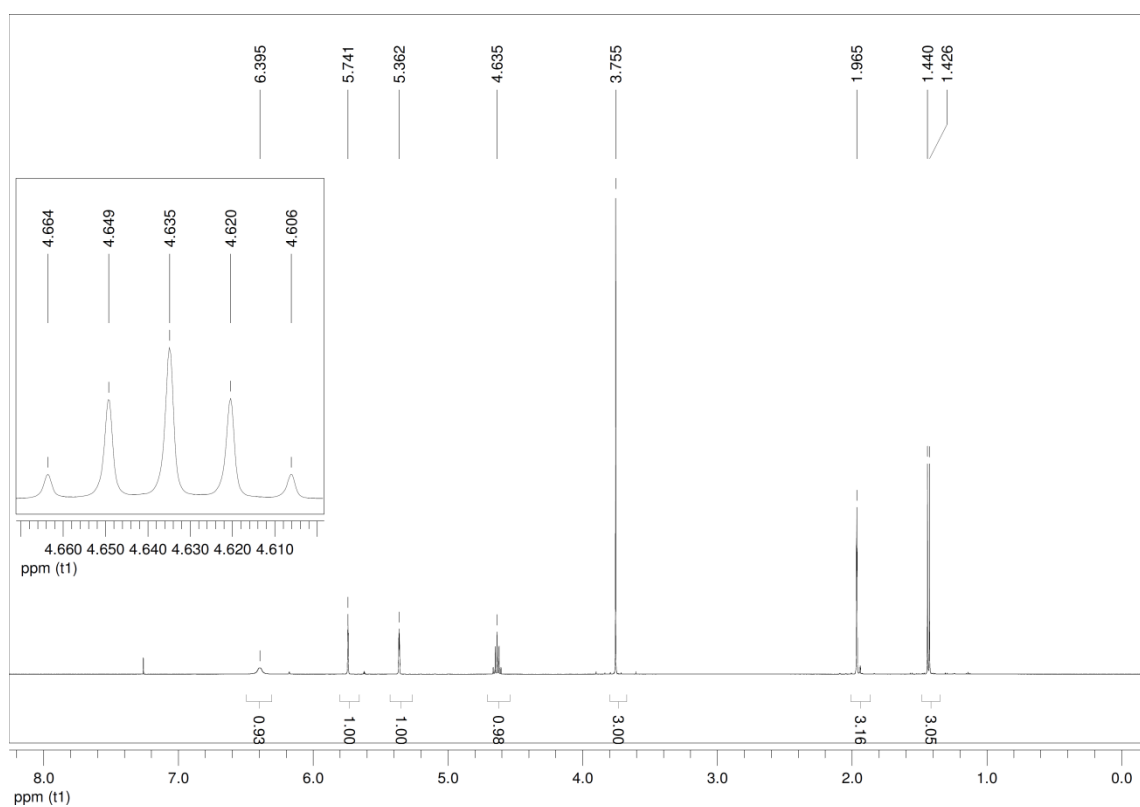
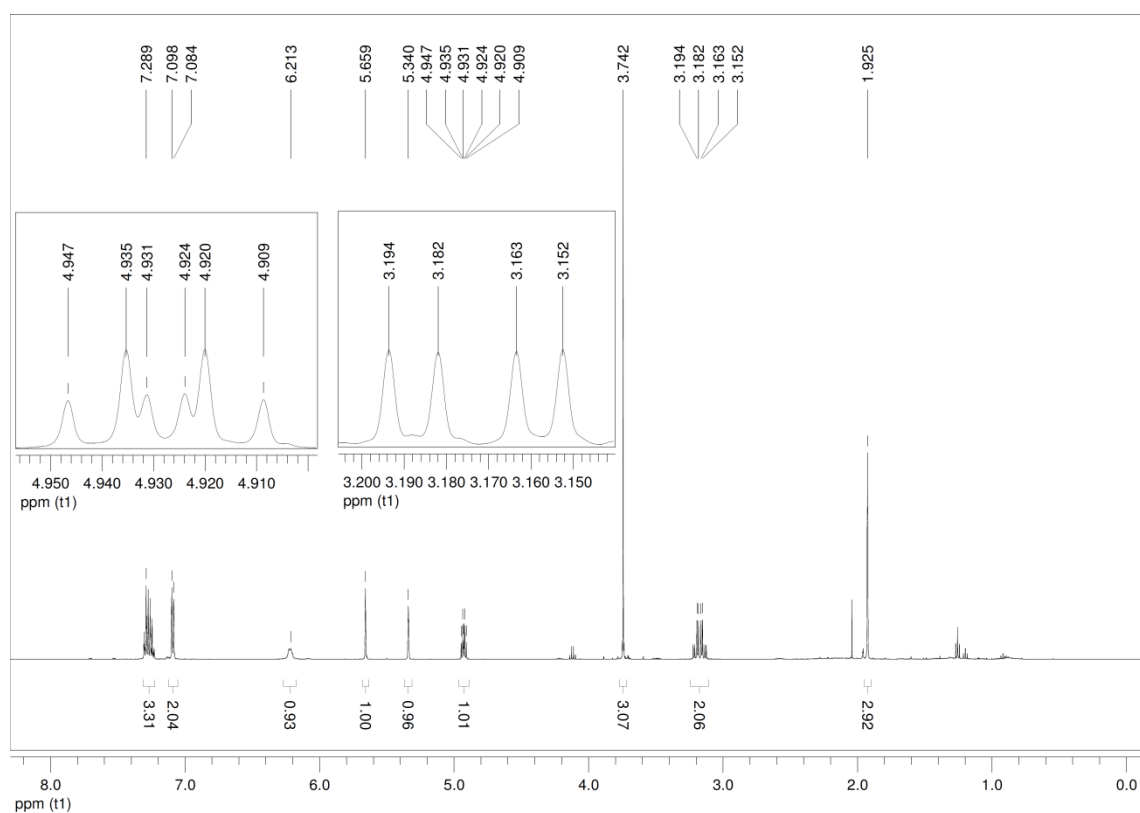
Abb. 8.12: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **6.2**.

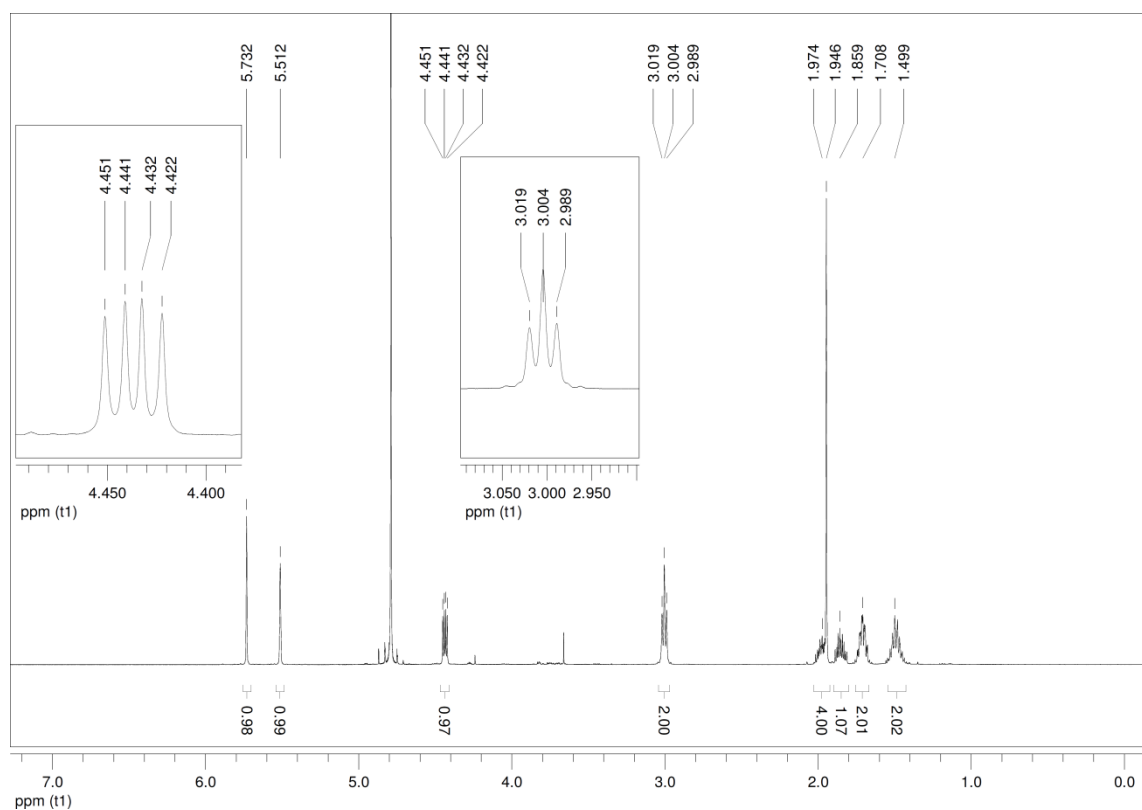
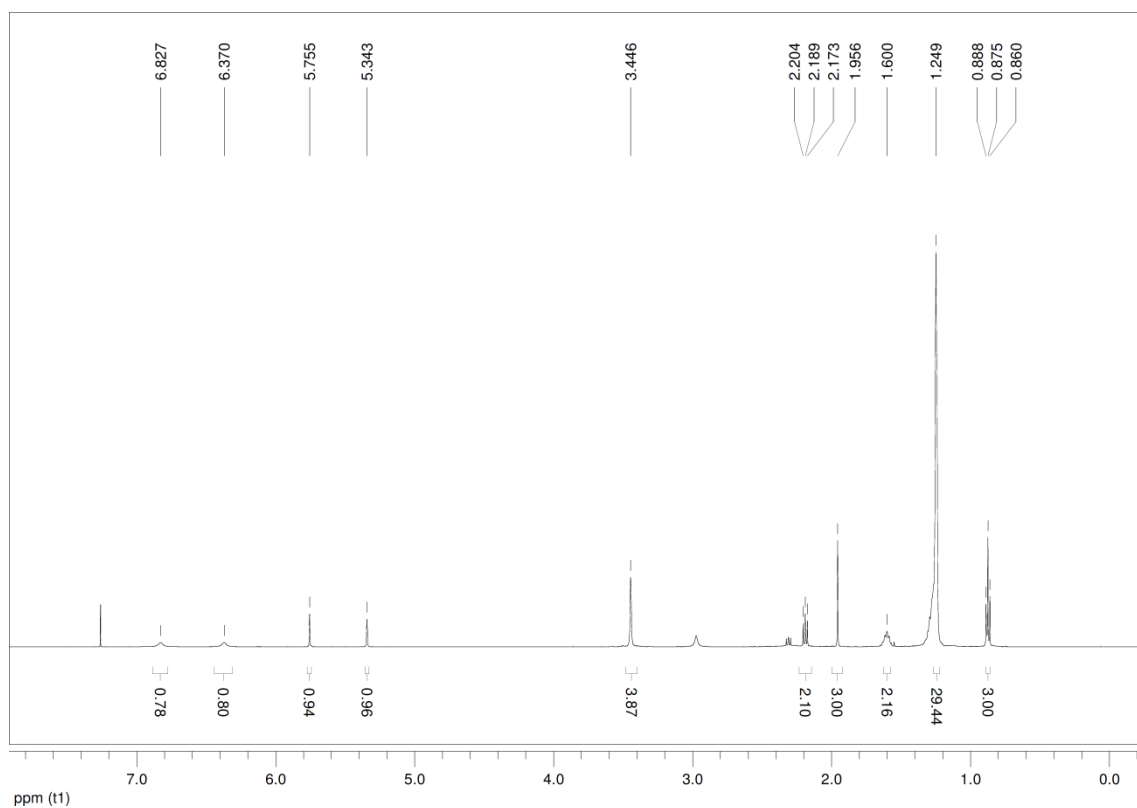
Abb. 8.13: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **6.3**.Abb. 8.14: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **6.4**.

Abb. 8.15: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in D₂O) von **6**.**CD-Monomer 9**Abb. 8.16: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d₆) von **9.1**.

Abb. 8.17: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d_6) von **9.2**.Abb. 8.18: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in DMSO-d_6) von **9**.

substratmimetische Monomere

Abb. 8.19: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **12**.Abb. 8.20: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl₃) von **14**.


Abb. 8.21: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in D_2O) von **13**.

Abb. 8.22: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz in CDCl_3) von **11**.